

**PIKOSEKUNDEN-FLUORESZENZ UND ENERGIETRANSFER VON
SELBSTAGGREGIERTEN CHLOROPHYLL A – MOLEKÜLEN**

**Strukturelle und dynamische Eigenschaften eines
Modellsystems für das photoaktive Zentrum PSII
der Photosynthese**

Vom Fachbereich Physik der
Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
angenommene
Dissertation

Wiprecht W. A. Keller
geb. am 21. März 1953
in Recklinghausen

1906

**PIKOSEKUNDEN-FLUORESCENZ UND ENERGIETRANSFER VON
SELBSTAGGREGIERTEN CHLOROPHYLL A – MOLEKÜLEN**

**Strukturelle und dynamische Eigenschaften eines
Modellsystems für das photoaktive Zentrum PSII
der Photosynthese**

Vom Fachbereich Physik der
Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
angenommene
Dissertation

Wiprecht W. A. Keller
geb. am 21. März 1953
in Recklinghausen

Erstreferent : Prof. Dr. K. Maier-Schwartz
Korreferent : Prof. Dr. W. Schmidt
Tag der Disputation : 12. November 1986

I. Einführung	1
II. Chlorophyll <u>a</u> in der Photosynthese	4
III. Die Spektren von Chlorophyll <u>a</u> in Absorption und Emission	15
1. Strukturmerkmale in den Spektren der elektronischen Übergänge von Chlorophyll <u>a</u>	16
2. Einfluß von Ligation und Aggregation auf die Spektren von Chlorophyll <u>a</u>	20
2.1 Monoligation von Chlorophyll <u>a</u> -Monomeren	22
2.2 Biligation von Chlorophyll <u>a</u> -Monomeren	23
2.3 Aggregation von Chlorophyll <u>a</u>	24
2.3.1 Selbstaggregation von Chlorophyll <u>a</u>	24
2.3.2 Mischaggregation von Chlorophyll <u>a</u>	25
IV. Experimentelles	27
1. Probenpräparation	28
1.1 Lösungsmittel	28
1.2 Chlorophyll <u>a</u> -Präparation	28
2. Absorptionsspektroskopie	30
2.1 Absorptionsspektrometer	30
2.2 Auswertung	30
3. Pikosekunden Fluoreszenzspektroskopie	32
3.1 Lasersystem	32
3.2 Zeitkorreliertes Photonenzählen	33
3.2.1 Versuchsaufbau	33
3.2.2 Meßverfahren	36
3.2.2.1 Fluoreszenzabklingkurven	37
3.2.2.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren	38
3.2.2.3 Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz	42
3.3. Auswertung	48
3.3.1 Übertragungsfunktion des Meßsystems	48
3.3.1.1 Zeitliches Verhalten	51
3.3.1.2 Spektrales Verhalten	53
3.3.2 Parameterextraktion (Fit)	53

V. Messungen an Chlorophyll <u>a</u> -Lösungen	56
1. Absorptionsmessungen von Chlorophyll <u>a</u> -Lösungen in Dodecan	56
1.1 Monomere	56
1.2 Dimere	59
2. Fluoreszenzmessungen von Chlorophyll <u>a</u> -Lösungen in Dodecan	63
2.1 Monomere	63
2.2 Dimere	67
3. Polarisationsanisotropiemessungen der Fluoreszenz von Chlorophyll <u>a</u> -Lösungen in Dodecan	83
3.1 Monomere	84
3.2 Dimere	85
VI. Diskussion	91
1. Absorption	92
1.1 Qualitative Beschreibung des Chlorophyll <u>a</u> -in vitro-Systems	92
1.2 Einfluß von Nukleophilen	94
1.3 Einfluß der Temperatur	96
1.4 Quantitative Analyse und Interpretation der Absorption des (Chl) ₂ -Systems	102
2. Fluoreszenz	108
2.1 Fluoreszenz des Chlorophyll <u>a</u> -Monomer	108
2.1.1 Spektren	108
2.1.2 Zerfallsfunktion des S ₁ -Zustands	109
2.1.3 Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz	109
2.2 Fluoreszenz der Chlorophyll <u>a</u> -Dimere	112
2.2.1 Spektren	112
2.2.2 Zerfallsfunktionen der S ₁ -Zustände	115
2.2.3 Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz	119
3. Interpretation des Chlorophyll <u>a</u> -in vitro-Systems	121
VII. Zusammenfassung	137
VIII. Literatur	140

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Å	Ångström (10^{-10} m)
ADC	Analog Digital Converter
C	Konzentration
CA	Core Antenna, inneres Antennensystem
CCL ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CFD	Constant Fraction Discriminator
Chl	Chlorophyll
(Chl) ₂	selbstaggregierter Chlorophyll a-Dimer
Chl*L	monoligierter Chlorophyll a-Monomer
cw-	continuous wave-, Dauerstrich-
DCM	Laserfarbstoff: 4-Dicyanomethylen-2-Methyl-6-(P-Dimethylaminostyryl)-4H-Pyran; (C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O)
DCMU	Dichlorophenyl-Dimethyl-Harnstoff
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ε	molarer Extinktionskoeffizient
E	Bildungsenthalpie
EtOH	Ethanol
F	Fluoreszenzintensität
F _{1..5}	Meßzeitfenster 1 bis 5 für zeitaufgelöste Spektren
G	Gauß
IP	Isopropanol, 2-Propanol
IR	Infrarot
λ	Wellenlänge des Lichts
k	Boltzmannkonstante
L	Lösungsmittelmolekül
LCAO-MO	Aus Atomorbitalen linear kombinierte Molekülorbitale
LHCP	Light Harvesting Complex Protein, Antennensystemproteinkomplex
ln	natürlicher Logarithmus
MCA	Vielkanalanalysator
MCH	Methylcyclohexan
NADP	Nicotin-Amid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
v	Wellenzahl des Lichts
nm	Nanometer (10^{-9} m)
ns	Nanosekunde (10^{-9} sec)
QE	Quantenausbeute
p	Amplitude der exponentiellen Fluoreszenzabklingfunktion
ps	Pikosekunde (10^{-12} sec)
PSI	Photosystem I, P700
PSII	Photosystem II, P680
ρ	effektiver Radius
r	Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz
R-OH	Polares Molekül (Alkohol, Wasser etc.)
S ₁	1. angeregter Singletzustand
τ	Zeitkonstante der Fluoreszenzabklingfunktion
T ₁	1. angeregter Tripletzustand
TAC	Time Amplitude Converter
TCPC	Time Correlated Photon Counting
UV	Ultraviolett
V	Volumen
η	Viskosität



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546313_0029

I. Einleitung

Durch die Photosynthese wird der Biosphäre pro Jahr ca. 10^{18} kJ (entspricht der Jahresproduktion von mehr als 30 000 Kernkraftwerken des Types von Tschernobyl bei pausenlosem Betrieb) aus der Energie des Sonnenlichtes zugänglich gemacht / 58/. Die physikalischen Vorgänge in den photoautotrophen Organismen, die diesen riesigen Energiespeichermechanismus ermöglichen, sind jedoch nur unvollständig bekannt. Das Chlorophyll a-Molekül übt hierbei die zentrale Funktion der Ladungstrennung aus / 24// 25/. Isoliert man jedoch das Chlorophyll a-Molekül aus der Pflanze, so geht diese Fähigkeit in polaren Lösungen verloren / 35/. Der Aggregationsgrad und die Beschaffenheit der unmittelbaren molekularen Umgebung der Chlorophyll a-Moleküle beeinflussen wesentlich ihr photo-physikalisches Verhalten. Die Entwicklung und das Verständnis solcher Systeme, in denen die mikroskopische Umgebung des Chlorophyll a definiert variiert werden kann, sind eine wertvolle Hilfe nicht nur für die Charakterisierung der Umgebungsverhältnisse in vivo sondern auch für die Aufklärung der physikalischen Mechanismen der photosynthetischen Primärprozesse.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem selbstaggregierten Chlorophyll a-Dimermolekül, das als Modellsystem ursprünglich von Katz et al. / 35/ vorgeschlagen wurde. Es gilt nach dem derzeitigen Wissen als geeignetstes Modell für das Photosystem II (PSII) des Photosyntheseapparates der Höheren Pflanzen . Die Zuordnung stützt sich hauptsächlich auf Messungen der Absorptionsspektren, die das Absorptionsmaximum des Dimer (Chl)₂ im Gegensatz zum Chlorophyll a-Monomer und anderen Aggregationsformen bei ca. 680 nm zeigen. Bei dieser Wellenlänge hat das PSII in der O₂-Produktion maximale Aktivität / 94/.

Optische Untersuchungen des Chlorophyll a-Moleküls und seiner Aggregate in der entsprechenden unmittelbaren molekularen Umgebung sind wichtige Sonden zur Untersuchung der Primärpro-

zesse der Photosynthese. Insbesondere konnten mit Hilfe der Laserpikosekundenspektroskopie die Zeitkonstanten einer Vielzahl von Reaktionsschritten des Photosyntheseprozesses bestimmt werden/ 30// 24// 59// 55/. Die Fluoreszenz des PSII wurde in den letzten Jahren an Chloroplasten eingehend untersucht / 31/. Mit ps-spektroskopischen Methoden konnten dem PSII Fluoreszenzlebensdauern von 180 bis 600 ps und 1.2 bis 2.4 ns zugeordnet werden, abhängig vom physiologischen Zustand des PSII-Reaktionszentrums.

Es wurde lange Zeit angenommen, daß - im Gegensatz zum PSII selbst - dessen Modellsystem keine Fluoreszenz zeigt. Dieser Widerspruch kann jedoch mit dem erstmals im Rahmen dieser Arbeit dargestellten zeitaufgelösten Fluoreszenzspektrum beseitigt werden. Möglich wurden diese Untersuchungen durch äußerst sorgfältige Präparation der Proben und durch die Verwendung intensitätsstabiler Pikosekunden-Lasersysteme im erforderlichen Wellenlängenbereich.

Zur Untersuchung des Modellsystems für das PSII wurde in dieser Arbeit eine Fluoreszenzmeßapparatur mit einem modengekoppelten, frequenzverdoppelten Nd^{3+} -YAG-Laser und einem synchrongepumpten Farbstofflaser aufgebaut. Die Zeitauflösung des verwendeten zeitkorrelierten Photonen-zählverfahrens mußte wegen der äußerst kurzen Zeitkonstanten der Fluoreszenz des Modellsystems bis zur physikalischen Grenze der Methode von ca. 30 ps (das entspricht ca. 30 GHz Frequenzbreite) optimiert werden.

Für die Messung von Energietransferparametern ergab sich die Notwendigkeit, ein Verfahren zu entwickeln, um die spektrale Verteilung der zeitaufgelösten Fluoreszenzpolarisationsanisotropie bestimmen zu können.

Im Kap.II dieser Arbeit werden die derzeitigen Erkenntnisse über das PSII des Photosyntheseapparates dargestellt. Dabei wird das Hauptgewicht auf Zusammenhänge gelegt, die mit Hilfe von Pikosekunden-Fluoreszenzspektroskopie gewonnen wurden.

Im Kap.III werden die heute bekannten molekularen Eigenschaften des Chlorophyll a erläutert, soweit sie für die Argumentation in der abschließenden Diskussion benötigt werden.

Im methodischen Teil, siehe Kap.IV, werden die experimentellen Anordnungen, das Nachweisverfahren und die Methode der Aufnahme von zeitaufgelöster Fluoreszenz und deren Polarisationsanisotropie beschrieben.

Ein wesentlicher Punkt ist hier die äußerst sorgfältige, nukleophilfreie Präparation des Modellsystems. Schon in Anwesenheit von sehr geringen Konzentrationen an Chlorophyll a-Monomeren ist die Fluoreszenz der Dimere kaum noch zu beobachten.

Im Kap.V werden die experimentellen Ergebnisse der Absorptions-, Fluoreszenz- und Anisotropiemessungen des Modellsystems vorgestellt. Es werden Kriterien genannt, an Hand von Spektren die Anwesenheit verschiedener Aggregationsformen von Chlorophyll a-Molekülen und Liganden zu erkennen.

Im Kap. VI werden die gewonnenen Daten qualitativ und quantitativ analysiert. Es wird ein Aggregationsmodell vorgeschlagen, das die vorliegenden Daten - insbesondere für die selbstaggregierten Chlorophyll a-Dimere - geschlossen interpretiert. Wichtigstes Ergebnis ist hier der Nachweis des intramolekularen Energietransfers im selbstaggregierten Chlorophyll a-Dimer, der Rückschlüsse auf die Konformation der beiden Teilmoleküle zuläßt.

II. Chlorophyll a in der Photosynthese

Photoautotrophe Organismen, die in der Lage sind die Energie des Sonnenlichtes direkt in einen Gewinn an freier Enthalpie zu transformieren, um schließlich physiologisch benötigte Verbindungen zu synthetisieren, lassen sich entwicklungsgeschichtlich in zwei Kategorien / 10/ einteilen. Die im Verlauf der Evolution früher entwickelten photosynthetischen Bakterien (z.B. *Rhodospseudomonas sphaeroides*) haben Bakteriochlorophyll a als Zentralpigment des Photosyntheseapparates. Zwischenstufe bei der Synthese dieses Pigmentes ist das Zentralpigment der zweiten Gruppe, das der Höheren Pflanzen, das Chlorophyll a. Dieses Chl a findet sich in einer Anzahl von je ca. 300 Molekülen in den photosynthetischen Einheiten im Bereich des Tylakoidmembransystems (s. Abb. II.(2)).

Innerhalb einer photosynthetischen Einheit (eine Grana Thylakoidmembran enthält mehrere hundert Einheiten) fungiert der Hauptteil der Chl a-Moleküle zusammen mit anderen (Akzessor-) Pigmenten als Absorber (Core Antenna: CA) für Lichtenergie des gesamten sichtbaren und angrenzenden UV-Wellenlängenbereiches. Daneben dienen diese Moleküle der Weiterleitung der Anregungsenergie zu speziellen Untereinheiten, den Reaktionszentren (PSI und PSII), den eigentlichen Orten der Ladungstrennung/ 10/.

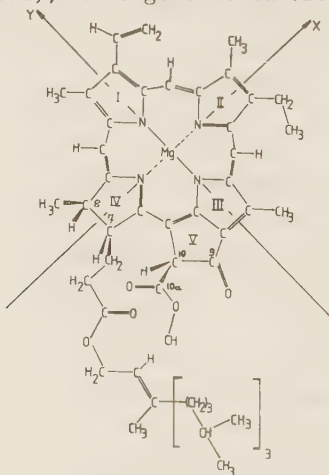


Abb. II.(1) Molekulare Struktur von Chlorophyll a

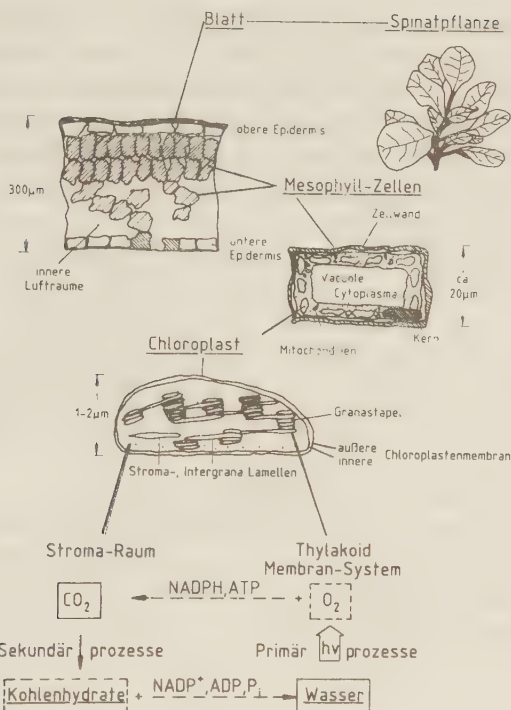


Abb. II.(2) Schema der strukturellen (oberer Bildteil) und funktionellen Gesamtorganisation der Photosynthese in Höheren Pflanzen; vereinfacht nach / 58/ (siehe dort nach Einzelheiten)

Die strukturelle Organisation der photosynthetischen Einheiten, insbesondere die des Antennensystems, ist noch weitgehend unbekannt. Erst in jüngster Zeit konnten mit Röntgenstrukturanalysen an Einkristallen aus Membran-Protein-Komplexen des Reaktionszentrums von photosynthetischen Bakterien direkte Aussagen über dessen Organisationsstruktur gemacht werden / 15/. Für die Höheren Pflanzen ist dies jedoch noch nicht gelungen; so ist zum Beispiel immer noch unklar, ob in jeder photosynthetischen Einheit jeweils nur ein einziges Reaktionszentrum existiert.

Im Jahre 1960 schlugen R. Hill und F. Bendall / 27/ das bekannte Z-Schema (s. Abb. II(2)) vor, ein Modell für die Zusammenwirkung der zwei Photosysteme PSII und PSI im Primärprozess der O_2 -produzierenden Photosynthese. Dieses Modell konnte im Laufe der Zeit durch Experimente gestützt und weiter verfeinert werden.

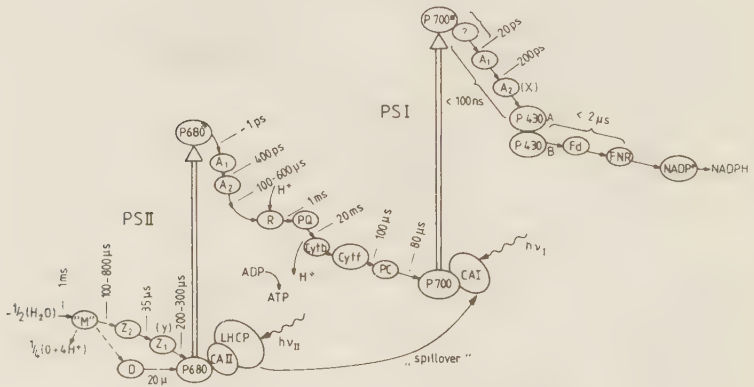


Abb. II.(3) Z-Schema der Photosynthese der Grünen Pflanzen; die Höhenlage der eingekreisten Systeme ist ein Maß für deren Redoxpotential; überarbeitet nach / 77/; die Zeiten geben die Dauer des Elektronentransfers an / 44/

"M"	: O_2 produzierender Komplex	PQ	: Plastochinon (frei)
$Z_{1,2}$	: Plastochinol	Cytb	: Cytochrom b
D	: (Hilfsdonor für P680)	Cytf	: Cytochrom f
P680	: PSII	PC	: Plastocyanin
CAII	: Core antenna des PSII	P700	: PSI
LHCP	: Antennenproteinkomplex	?	: Pheophytin ?
A_1 (II)	: Pheophytin	P430	:
A_2 (II)	: Plastochinon (geb.)	Fd	: Ferredoxin
R	: Plastochinon (geb.)	FNR	: Fd- $NADP^+$ -Reduktase
A_1 (I)	: Chl <u>a</u> -Monomer	A_2 (I)	: Fe-S-Protein

Das PSI (P700) wird zunächst durch Photonabsorption auf ein Redoxpotential von mehr als 0.8 V angehoben. Das PSI wird heute allgemein / 32// 33/ als ein "special pair" Chl a-Dimer mit C_2 -Symmetrie angenommen. Anlaß für diese Vermutung geben ESR Experimente, die in vivo nach Photoanregung eine Breite des ESR-Signals von ca. 7 G zeigen, wogegen der Chl a-Monomer in vitro eine Breite von 9.3 G zeigt / 69/. Spin sharing der zwei engbenachbarten, parallelen π -Elektronensysteme von "special pair"-Dimeren führt auch in vitro zu einer entsprechenden Linienverschmälerung. Absorptionsspektren und Fluoreszenzspektren solcher Dimere in vitro unterstützten die Vermutung, daß das PSI ein mit Hilfe von bifunktionalen Liganden gebildeter Chl a-Dimer ("special pair") ist.

Der direkte Akzeptor des nach der Anregung schwächer gebundenen Elektrons ist nicht bekannt, es gibt Hinweise, daß es sich um ein Chl a-Monomer oder ein Fe-S-Protein handelt. Die Reduktionskette setzt sich über mehrere Zwischenstufen (s. Abb. II.(3)) weiter fort, bis letztlich als Protonenspeicher NADP^+ zu NADP reduziert wird. Die Zeitkonstanten für die verschiedenen Reaktionen liegen im Bereich von wenigen Piko-sekunden bis hin zu Millisekunden (s. Abb. II.(3)). Nach der Oxidation des PSI wird das entstandene Loch entweder durch ein Elektron aus einer Kreisreaktion über das Ferredoxin und das Cytochrom 563 aufgefüllt oder aber durch ein Elektron aus einer Redoxkette, an deren Anfang das - durch Photoanregung auf Redoxpotential 0.4 V gehobene - PSII (P680) steht.

Vom PSII ist im Augenblick nur bekannt, daß es sich um mindestens ein Chl a-Molekül handeln muß.

Der primäre Akzeptor des Elektrons aus dem PSII ist ein Pheophytin a (ein Chl a-Molekül, bei dem das Mg-Zentralatom durch zwei Wasserstoffatome substituiert ist). Bei der anschließenden Reduktion des oxidierten PSII wird über noch nicht vollständig bekannte Zwischenschritte H_2O in zwei Protonen und $1/2 \text{ O}_2$ gespalten / 25/.

Zwischen den CA's der beiden Reaktionszentren PSI und PSII kann Energie, die in einem der beiden nicht benötigt wird, weil der entsprechende Redoxprozess bereits in Gang gesetzt worden ist, über einen Chl a/b-Pigment-Proteinkomplex (LHCP) ausgetauscht werden. Normalerweise ist der LHCP jedoch bedeutend stärker an das PSII gekoppelt und unterstützt dessen speziellen CA.

Da die Abmessungen des Photoaktiven Zentrums sehr klein sind (18 x 16 x 10 nm / 56/) und die volle Funktionsfähigkeit nur in der intakten Thylakoidmembran gegeben ist, sind Untersuchungen der verschiedenen Einzelkomponenten nur bedingt möglich.

In jüngster Zeit zeigen zwei Methoden in der Photosyntheseforschung besonders große Erfolge. Durch molekulargenetische Entschlüsselung der DNA-Sequenzen der Chloroplastgene konnten vermehrt Informationen über die Struktur und Anordnung der Proteinkomplexe der Photosysteme gewonnen werden / 60/.

Weiterhin konnte die Zeitauflösung in spektroskopischen Untersuchungen wesentlich (ca. 70 fsec) verbessert werden und in der Photosyntheseforschung erfolgreich angewendet werden / 55// 31/. Die nähere funktionelle sowie lokale Umgebung des PSII stellt sich heute wie folgt dar:

Das PSII ist in mindestens drei Funktionsgruppen involviert. Es bildet das Anfangsglied der Redoxkette (ASC = Acceptor Side Complex), die letztlich das oxidierte PSI wieder reduziert / 70/, es ist das Endglied einer Redoxkette (OEC = Oxygen Evolving Complex), an deren Anfang die Wasserspaltung ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + 1/2 \text{O}_2$) steht / 25/ und ist weiterhin der letzte Akzeptor derjenigen Energie aus dem CA, die die beiden zuerst genannten Prozesse antreibt / 31/.

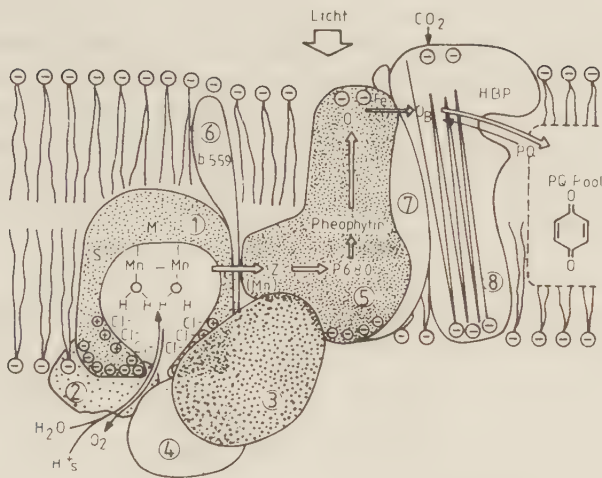


Abb. II.(4) Arbeitsmodell für die Organisation der PSII-Komponenten in der Thylakoidmembran; Bezeichnungen siehe Text; vereinfacht nach / 25/

Die funktionalen Einheiten (2)(3)(4), denen die eigentliche Funktion der O_2 Produktion zugeschrieben wird, sind an der Innenseite der Thylakoidmembran angeordnet (s. Abb. II.(4)). Die genaue chemische Abfolge der O_2 Produktion ist noch nicht bekannt. Es werden offensichtlich jedoch für die Reaktion neben einer unbekannten Anzahl von Cl^- und Ca^{2+} -Ionen wahrscheinlich vier Mn Atome benötigt, die mit dem mehr im Inneren der Membran befindlichen "M"-Zentrum (wahrscheinlich 2 Mn je M-Zentrum) (1) assoziiert sind.

Das Photosystem II (Chl a) mit dem primären Elektronenakzeptor (Pheophytin) befindet sich in einem Polypeptid (5) zusammen mit dem primären Elektronen Donor (Z) und einem gebundenen Plastoquinon (Q_A) als sekundärem Elektronenakzeptor. Es erstreckt sich über die gesamte Dicke der Thylakoidmembran. Engbenachbart befinden sich der Antennenkomplex (7) und ein

Polypeptid (8), das den zweiten gebundenen Plastoquinon-Elektronenakzeptor enthält, und das die Stelle darstellt, an der Herbizide wie DCMU ankoppeln (HBP = Herbicide-binding Protein), die den Elektronentransport vom PSII blockieren. Durch eine solche Blockade, die auch durch wiederholte Anregung des PSII durch starke Lichteinstrahlung erzeugt werden kann (geschlossener Zustand des PSII), ändert sich das spektroskopische Verhalten des Photosystems und es können Rückschlüsse auf Kinetiken und Organisationsformen gezogen werden. Details über die Struktur des Antennensystems sind hierbei besonders erfolgreich erforscht worden. Dies ist nicht verwunderlich, da nahezu 100% der Chl a- und 100% der Chl b-Pigmente sich im LHCP befinden. Kinetische Studien stellen jedoch, z.B. durch Rückwirkungsmechanismen, auch Informationen über das schwächer konzentrierte PSII zur Verfügung.

In den O_2 produzierenden Pflanzen stammt die beobachtete Fluoreszenz hauptsächlich aus dem Bereich des PSII, während das PSI kaum fluoresziert. Trotzdem ist die Fluoreszenz in ihrer Abklingkinetik sehr komplex und muß, wenn man natürliche (exponentielle) Zerfallscharacteristica annimmt, als Überlagerung von mindestens drei Exponentialfunktionen aufgefasst werden / 69/. Diese drei Komponenten unterscheiden sich zudem noch sowohl in den Lebensdauern als auch in den Amplituden, wenn das PSII entweder im geschlossenen (d. h. der Elektronentransport weg vom PS ist blockiert) oder offenem Zustand ist. Im geschlossenen Zustand ist die Fluoreszenzausbeute maximal ($F_{\max}$) und geht im offenen Zustand auf $1/4$ zurück (F_0) / 52/. Diese schwache Fluoreszenz korrespondiert mit einer äußerst kurzen Fluoreszenzlebensdauer von 80 ps / 58/. Sie kann im Bereich der größten Wellenlängen des Absorptionsspektrums bevorzugt angeregt werden und ist im Emissionsmaximum gegenüber der restlichen Fluoreszenz rot verschoben. Sie ist zudem unempfindlich gegen PSII-Inhibitoren und kann deshalb dem PSI zugeschrieben werden.

Die Fluoreszenz aus der Umgebung des PSII zeigt im F_0 Zustand

zwei Fluoreszenzkomponenten mit Lebensdauern von 180-300 ps (kurze Komponente) und 600 ps (mittlere Komponente) / 58/ und außerdem, wenn man eine 4-Komponentenanalyse der Fluoreszenz-abklingfunktion durchführt, eine schwache Fluoreszenz mit einer Lebensdauer von ca. 2 ns (lange Komponente). Bei geschlossenen PSII-Zentren ($F_{\max}$) erhöht sich die Amplitude der langen Komponente um den Faktor 60, was zur Erhöhung der Gesamtfluoreszenz um den bekannten Faktor $1/4$ beim Übergang von F_0 nach $F_{\max}$ führt.

Die Ergebnisse der Kinetikstudien mehrerer Arbeitsgruppen / 31/ wurden in der letzten Zeit im Rahmen von zwei Modellen der Organisationsstruktur der Antennensysteme der Photosysteme diskutiert.

Modell 1 ist das dreigeteilte Organisationsmodell (LHCP, CA und PSII) von Butler et al. / 9/ / 8/. Im Zustand F_0 wird die schnelle Komponente der PSII-Fluoreszenz der Einfangszeitkonstante der Excitonen des PSII-CA zugeordnet. Während die mittlere Zeitkonstante, die der Lebensdauer der Excitonen im LHCP zugeschrieben wird, im F_0 ca. 600 ps beträgt, verdoppelt sie sich im $F_{\max}$. Die lange Komponente im $F_{\max}$ (ca. 2 ns) wird entweder Rekombinationslumineszenz in den geschlossenen PSII-Zentren zugeordnet oder aber einer direkten Antennenfluoreszenz zugeschrieben.

Da dies eine schwache Kopplung des LHCP an die CA des PSII impliziert und unterschiedliche Fluoreszenzraten -je nach Öffnungszustand des PSII - aus dem LHCP voraussetzt, konzentrieren sich die Vorstellungen in der letzten Zeit mehr auf ein Modell, das von zwei heterogenen PSII-Einheiten (PSII_α und PSII_β) und einer starken Kopplung zwischen LHCP und CA ausgeht / 42// 45/.

Holzwarth / 31/ veröffentlichte 1986 ein schematisches Modell der PSII-Organisation auf der Basis der heterogenen Zentren, das die Ergebnisse der letzten Jahre miteinander in Einklang bringen kann (s. Abb. II.(5)). Mit diesem Modell sind die verschiedenen, exponentiellen Fluoreszenzabklingzeiten (Tab. II.(2)) konsistent zu erklären.

	PSII offen(F_0)	PSII geschlossen (F_{max})
PSII $_{\alpha}$	180-300 ps	2.2-2.4 ns
PSII $_{\beta}$	500-600 ps	1.2-1.4 ns
PSI	70-100 ps	70-100 ps

Tab. II.(2) Vermutete Beziehungen zwischen Zerfallskomponenten der Fluoreszenz der Photozentren bei offenen oder geschlossenen PSII unter Annahme der α/β - Heterogenität vom PSII / 31/

In dem vorgeschlagenen Heterogenitätsmodell sind die α - und β -Zentren lateral deutlich voneinander getrennt. Während sich die α -Zentren vorwiegend im Bereich der zusammengepressten Membranregion (Grana) konzentrieren, finden sich die β -Zentren zusammen mit den PSI vorzugsweise im Stroma-exponierten Bereich der Thylakoide. Im F_0 - Zustand zeigen die β -Zentren eine deutliche Wechselwirkung untereinander, die im F_{max} - Sättigungszustand reduziert ist. Während die α -Zentren eine Ladungstrennungseffizienz von ca. 0.9 haben sollen, ist diese in den β -Zentren nur mit ungefähr 0.5 bis 0.6 anzunehmen.

Der Regulationsmechanismus beim Übergang vom Zustand F_0 zum Zustand F_{max} soll durch die hohe Mobilität der LHCP-Komplexe gegeben sein, die phosphoryliert die enge Kopplung zwischen den - im F_0 isolierten - PSI und β -Zentren bewirken. Dies Modell geht also davon aus, daß ca. 30% der Chl a-Pigmente des PSII mobil sein müssen.

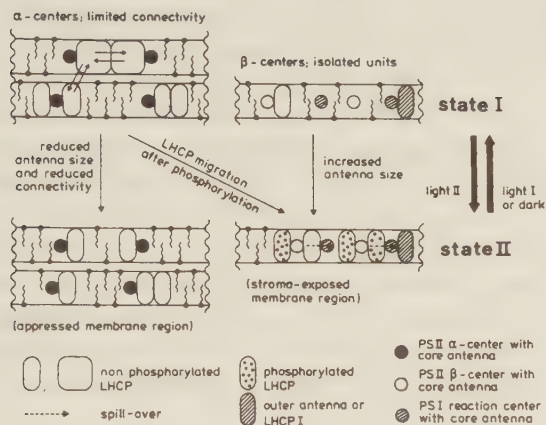


Abb. II.(5) Schematisches Modell der PSII-Antennenorganisation in Abhängigkeit vom Sättigungszustand (F_0 = state I; $F_{\max}$ = state II); übernommen aus / 31/.

Während in vivo die Antennenbereiche der Photosysteme wegen ihrer hohen Pigmentkonzentration relativ gut erforscht werden können, sind die physikalischen Eigenschaften der eigentlichen Photosysteme nur schwer zu untersuchen. Da über die spektroskopischen Details des PSII nur relativ wenig bekannt ist, können auch über dessen Identität im Augenblick nur eingrenzende Aussagen gemacht werden.

Es empfiehlt sich hier die Analyse von Modellsystemen, die in ihren Verhalten den Photosystemen entsprechen.

Nach heutigem Wissensstand ist das Photosystem PSII entweder ein Chl a-Monomer in besonderer Umgebung / 72/ oder ein selbstaggregierter Chl a-Dimer / 36// 80/. Evidenzen für die Bevorzugung einer dieser Formen ergeben sich aus einer Vielzahl von Experimenten: Die Gaußlinienbreite des oxidierten

PSII in vivo ist mit ca. 9.5 G die eines Chl a-Monomeren in vitro (9.3 G) / 69/. Weiterhin zeigen O₂-Aktivitätsspektren von intakten PSII ein Aktivitätsmaximum bei 680 nm / 77/. Absorptionsspektroskopische Daten zeigen, daß in vitro Chl a-Komplexe unter Beteiligung bifunktionaler Liganden (H₂O, R-OH) wie sie die "special pairs" darstellen stets Absorptionsmaxima an Wellenlängen deutlich oberhalb von 680 nm haben. Chl a-Monomere weisen jedoch ihr Absorptionsmaximum bei ca. 660 nm auf. Selbstaggregierte Chl a-Dimere in unpolaren Lösungsmitteln zeigen jedoch eine Absorptionsbande bei 680 nm, die sich auch bei höheren Aggregationsformen nicht zu größeren Wellenlängen hin verschiebt. Diese Aggregate zeigen weiterhin kaum Anzeichen für Wechselwirkung zwischen den π -Elektronensystemen, was sich in einem breiten Gaußprofil in den ESR-Messungen / 69/ äußert.

Faßt man dies alles zusammen, so erscheint der selbstaggregierte Dimer des Chl a das derzeit geeignetste Modell für das PSII zu sein.

III. Die Spektren von Chlorophyll a in Absorption und
Emission

1. Strukturmerkmale in den Spektren der elektronischen
Übergänge von Chlorophyll a
2. Einfluß von Ligation und Aggregation auf die Spektren
von Chlorophyll a
 - 2.1 Monoligation von Chlorophyll a-Monomeren
 - 2.2 Biligation von Chlorophyll a-Monomeren
 - 2.3 Aggregation von Chlorophyll a
 - 2.3.1 Selbstaggregation von Chlorophyll a
 - 2.3.2 Mischaggregation von Chlorophyll a

1. Strukturmerkmale der Spektren der elektronischen Übergänge von Chlorophyll a

Das Absorptionsspektrum von Chlorophyll a wird durch eine relativ schmale Absorptionsbande (Q) (mol. Extinktionskoeffizient ca. $10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) im Bereich von 660 nm und eine etwas stärkere, breite Bande (B-Bande oder Soret-Bande) bei 430 nm charakterisiert.

Die wesentlichen spektralen Characteristica der π - π^* -Übergänge von Chlorophyll a werden durch die relativ symmetrische Basisstruktur (s. Abb. II.(1)) bestimmt / 68/. Diese Grundstruktur ist die eines, aus vier Pyrrolringen (s. Abb. III.1(1)) über Methinbrücken gebildeten, geschlossenen Ring-systems (Porphyrin) mit 16 inneren Partnern und 18 π -Elektronen (Abb. III.1(1)).

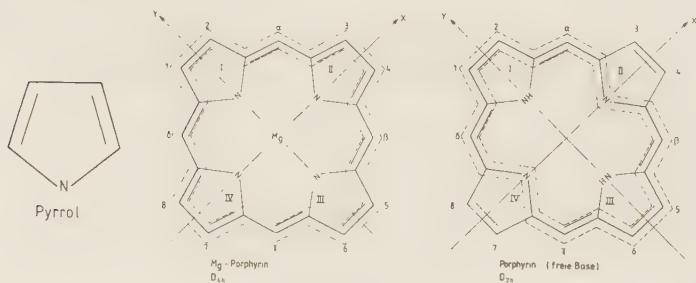


Abb. III.1(1) a) Pyrrolring, b) Mg-Porphyrin, c) Porphin

Die ungefähre Struktur des Absorptionsspektrums von Chl a findet sich bereits in FEMO-Modellrechnungen / 23/ / 62/ für einige elektronische Übergänge in den chemisch verwandten, aber symmetrischeren (Metallo-) Porphyrinen (s. Abb. III.1(1)).

Im Mg-Porphyrin (D_{4h}-Symmetrie) sind die Absorptionsübergänge

bezüglich der Polarisation in x- bzw. y-Richtung entartet. Reduziert man die Symmetrie des Makrorings (z.B. zu D_{2h} -Symmetrie der freien Base des Porphyrins (Chlorin s. Abb. III.1(1))), spalten insbesondere die "roten" Q-Banden in zwei orthogonal polarisierte Übergänge auf / 48// 49/. Die Dipolmomente beider Übergänge liegen in der Ringebene, wobei Q_y senkrecht auf Q_x steht.

Eine ähnliche Aufspaltung ist durch die entsprechende Symmetriereduktion des Makrorings des Chl a durch die Absättigung der Positionen 7 und 8 im Ring IV gegeben (s. Abb. I(1)). Diese, so zeigen Hückel LCAO-MO Rechnungen /34/, bewirkt weiterhin ein Ansteigen der Absorptionsstärke in den Q-Banden (Quasi-erlaubt) auf Kosten der Soret-Banden.

Dagegen wirkt sich weder die Präsenz des Mg-Zentralatoms noch die von Substituenten, die nicht direkt an den konjugierten Bindungen des Chlorin-Ringsystems beteiligt sind, spektral drastisch aus.

Die wichtigsten beiden Substitutionen am Chl a-Makroring sind die Veresterung des Propionsäurerestes am C_7 mit dem hydrophoben Phytol, und der isozyklische Pentanonring V mit der Ketocarbonylgruppe am C_9 .

Ab initio CI (Configuration Interaction) Rechnungen / 54/ am Ethylchlorophyllid a (Phytyl-Kette des Chl a durch eine Ethylen-Gruppe ersetzt) zeigen, daß die Absorptionsbanden im Sichtbaren nur den beiden bekannten, niedrigstenergetischen $\pi-\pi^*$ Übergängen nach S_1 (Q_y) und S_2 (Q_x) zuzuordnen sind; Einflüsse des Cyclopentanonringes sind erst in den Soret-Banden (B), und dort auch nur ohne strukturelle Identifikationsmöglichkeit, zu erwarten.

In der Triplettmanigfaltigkeit von Ethylchlorophyllid a liegen der T_1 und der T_2 energetisch unterhalb vom S_1 , während der T_3 annähernd die gleiche Übergangsenergie hat wie der S_1 / 54/.

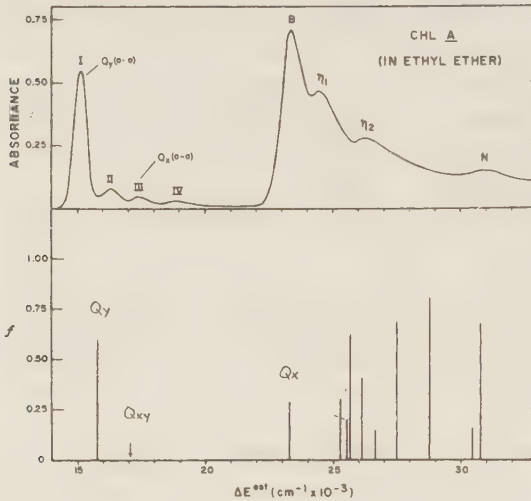


Abb. III.1(2) Chl a in Diethylether (oberer Teil); berechnete Bandenlage und Oszillatorenstärke von Ethylchlorophyllid (s. Text); entnommen aus / 54/

Bande	Position cm^{-1}	(nm)	Höhe $\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Zuordnung
I	15.170	659	84.900	$Q_y(0,0)$
II	16.310	613	13.000	$Q_y(0,1)$
III	17.400	575	7.100	$Q_y(0,2), Q_x(0,0)$
IV	18.860	530	3.800	$Q_x(0,1)$

Tab. III.1(1) sichtbare Absorptionsbanden von Chl a in Diethylether (s. Abb. III.1(2))/ 66/

Die Interpretation eines allgemein akzeptierten, experimentell gewonnenen Spektrums von Chl a in Diethylether sieht

heute wie folgt aus / 54/ /98/ / 66/:

Die Banden I-IV (s. Abb. III.1(2)) sind den beiden Übergängen Q_y ($S_0 - S_1$) und Q_x ($S_0 - S_2$) zuzuordnen. Beide Übergänge liegen in der Ringebene, wobei Q_y in der Richtung der Verbindungslinie der Stickstoffatome N(I) - N(III) und Q_x in der Richtung N(II) - N(IV) (s. Abb. II.(1)) polarisiert ist. Beide zeigen auch mindestens zwei diskrete vibronische Banden, wobei $Q_y(0,2)$ und $Q_x(0,0)$ energetisch entartet sind (Tab. III.1(1)).

2. Einfluß von Ligation und Aggregation auf die Spektren von Chlorophyll a

Aus der Pflanze isoliert kann Chl a in den unterschiedlichsten Lösungsmitteln gelöst werden (nicht jedoch z. B. in reinem Wasser). Die Spektren von Chl a unterscheiden sich, je nach verwendetem Lösungsmittel, zum Teil erheblich / 64/ / 50/.

Die Ursachen für diese Unterschiede liegen zum einen in den rein physikalischen Wechselwirkungen zwischen Chl a und Lösungsmittel (Polarität, Polarisierbarkeit etc.), zum anderen in chemischen Wechselwirkungen (Bildung von chemischen Verbindungen aus Chl a und Lösungsmittel, Chl a-Molekülen untereinander etc.)

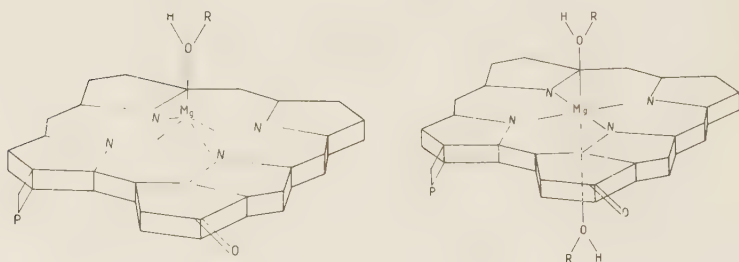


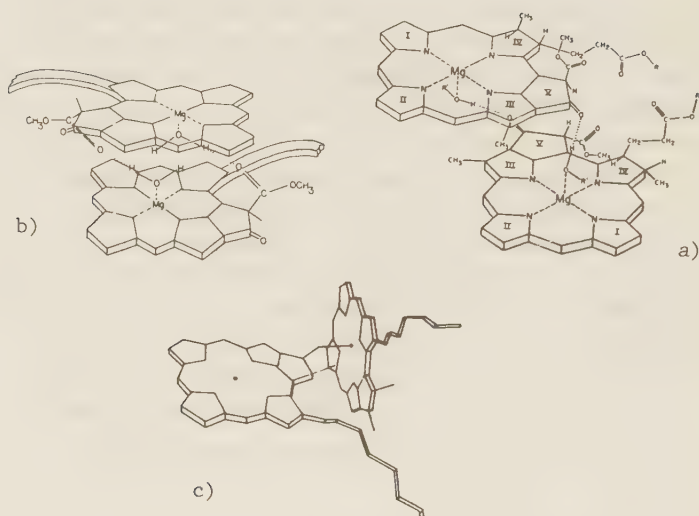
Abb. III.2(1) Koordinationshypothesen für Chl a in pol. Lösungsmitteln:

- a) pentakoordiniertes Mg-Zentralatom
- b) hexakoordiniertes Mg-Zentralatom

P = Phytylrest, =O Keto-Gruppe

Klassifiziert man die möglichen Aggregationsformen, die Chl a in freier Lösung eingehen kann, fallen drei Aggregationsformen auf, die man wiederum unterschiedlichen Gruppen von Lösungsmitteln zuordnen kann:

- a) Chl a-Monomere, in denen das Mg-Zentralatom neben der vierfachen Koordination zu den N-Atomen des Chlorinringes einen fünften (Lösungsmittel-) Liganden besitzt (Pentakoordination in polaren Lösungsmitteln, s. Abb. III.2(1))
- b) Chl a-Monomere, in denen dem Mg-Zentralatom zwei zusätzliche Liganden aufgezwungen werden (Hexakoordination, in extrem polaren Lösungsmitteln; s. Abb. III.2(2))
- c) Chl a- Dimere bzw. Oligomere, die sich durch Selbstaggregation (s. Abb. III.2(2)) auf Grund des amphoteren Charakters (nichtpolarer Phytyl-Rest und polare Gruppen am Ringsystem) bilden (in nichtpolaren Lösungsmitteln; s. Abb. III.2(2))
- d) Chl a- Dimere, die indirekt über bifunktionale Liganden (Heteroaggregation) gebildet werden und C₂-symmetrische Anordnung ("Cofacials" bzw. "Special Pairs") der Makroringe zeigen (in nichtpolaren Lösungsmitteln mit polaren Lösungsmittelanteilen bei tiefen Temperaturen; s. Abb. III.2(1))

Abb. III.2(2) Aggregationsformen von Chl a-Dimeren

- a) Bindung zwischen C₉-Ketogruppe und Mg-Zentralatom indirekt über bifunktionalen Ligand (R'-OH); aus / 6/
- b) Bindung zwischen C₁₀-Ketogruppe und Mg-Zentralatom indirekt über bifunktionalen Ligand (H₂O); aus / 81/
- c) Bindung direkt zwischen C₉-Ketogruppe und Mg-Zentralatom; aus / 82/

2.1 Monoligation von Chlorophyll a-Monomeren

In polaren Lösungsmitteln wie Alkoholen, sowie Mischungen von polaren und unpolaren Lösungsmitteln liegt Chl a bei Zimmertemperatur als Monomer in pentakoordinierter Form vor. Das Absorptionsspektrum entspricht im sichtbaren Spektralbereich weitgehend dem von Chl a in Diethylether (Abb. III.1(2))/64/.

Einflüsse von empirischen Lösungsmittelparametern wie Elektrophilität und Nukleophilität sind –neben leichten Verschiebungen der Q_y Banden –hauptsächlich in den Soretbanden zu beobachten / 57/.

Polarisationsanisotropiespektren der Fluoreszenz (s. Kap.IV.3.2.2.3) zeigen –neben einer Polarisationanisotropie von nahezu 0.4 im Bereich der Q_y Bande –bei 580 nm ein deutliches, negatives Minimum, was die Zuordnung zur Q_x (0,0) Bande nahelegt / 83/.

Die Fluoreszenz von pentakoordiniertem Chl a ist nur wenig stokesverschoben (ca. 8 - 10 nm) und mit Quantenausbeuten von ca. 0.2 bis 0.3 relativ stark / 73/ / 5/ / 28/ / 50/.

Die Fluoreszenz zeigt neben der Hauptbande (0,0) die zugehörige Schwingungsseitenbande (0,1) im Abstand von 1140 cm^{-1} . Fluoreszenzlebensdauern der monoligierten Chl a- Moleküle werden im Bereich von 5 nsec bis 8 nsec beobachtet / 11/ / 21/ / 2/.

2.2 Biligation von Chlorophyll a-Monomeren

In Lösungsmitteln, die eine Hexakoordination des Mg-Zentralatom des Chl a erzwingen (z.B. Pyridin) zeigen die Absorptionsspektren, besonders bei tiefen Temperaturen / 35/, zwischen der Q_y (0,0) Bande und der Q_y (0,1) Bande eine neue Bande (633 nm), die dem Q_x (0,0) Übergang zugeschrieben wird /17/. Diese Annahme basiert hauptsächlich auf Messungen von Polarisationsanisotropiespektren / 35/.

In den Fluoreszenzspektren wird ein Emissionsmaximum bei 680 nm (14.700 cm^{-1}) beobachtet / 11/. Die Lebensdauer der Fluoreszenz wird im Bereich von 6.44 ns / 11/ und 7.10 ns /78/ gemessen.

Im Bereich hoher Konzentrationen wird die Fluoreszenz der Monomere effektiv gelöscht. Geringe Veränderungen in den Absorptionsspektren legen die Annahme nahe, daß im Bereich höchster Konzentrationen (ca. $10^{-2}\text{ mol l}^{-1}$) neben Stoß-

quenching zwischen angeregten und nichtangeregten Molekülen auch Energieübertrag auf effektiv nicht fluoreszierende Dimere als Mechanismus in Frage kommt / 78/.

2.3 Aggregation von Chlorophyll a

2.3.1 Selbstaggregation von Chlorophyll a

In unpolaren Lösungsmitteln, die frei von nukleophilen Verunreinigungen (z.B. Wasser) sind (= trocken) werden drastische Unterschiede gegenüber dem Absorptionsspektrum in polaren Lösungen, sowie fast vollständiges Fehlen der Fluoreszenz von Chl a beobachtet / 5/ / 12/ / 12/ / 75/ / 38/. Dies wird der Bildung von selbstaggregierten Chl a-Dimeren zugeschrieben, die sich über eine Koordinationswechselwirkung zwischen dem Mg-Zentralatom des einen Partners (d. i. (Elektronen-) Akzeptor) und der Ketokarbonylgruppe des anderen Partners (= (Elektronen-) Donor) manifestiert / 66/ / 35/, ohne daß weitere Moleküle beteiligt sein müssen (s. Kap. III.2.3.2). Hinweise auf die Beteiligung dieser beiden funktionalen Gruppen geben insbesondere IR-Absorptionsspektren / 35/, in denen, bei "trockener" Präparation / 3/ der Proben, eine zusätzliche starke Linie bei 1664 cm^{-1} auftaucht, die der $\text{C=O} \cdots \text{Mg}$ Streckschwingung zugeordnet wird / 35/.

Im Gegensatz zu komplanaren Dimerkonformationen, die sich unter anders gearteten experimentellen Gegebenheiten / 21/ / 35/ (s. Kap. III.2.3.2) bilden, läßt die Struktur der Absorptionsspektren von selbstaggregierten Dimeren eine sehr geringe Wechselwirkung zwischen den π -Elektronensystemen der Teilmoleküle vermuten. Die Absorptionsspektren lassen sich vielmehr als Überlagerung der Spektren zweier unterschiedlich stark gestörter Chl a-Moleküle interpretieren, wobei der (Elektronen-) Akzeptor gegenüber dem Chl a-Monomer einer geringeren Störung ausgesetzt ist, als der (Elektronen-) Donor. Am Donor wirkt sich die Bindung über die Ketogruppe am C_9 wegen deren Beteiligung am π -Elektronensystem bedeutend

stärker aus/ 66/ / 67/ .

Die Fluoreszenzspektren des selbstaggregierten Dimers wurden erstmals im Laufe dieser Arbeit dargestellt und zeigen im Gegensatz zu den Monomerspektren im Bereich des $Q_y(0,0)$ -Übergangs eine Doppelstruktur / 38/ / 75/ . Diese Struktur und die zugehörigen Lebensdauern der Fluoreszenz bedürfen einer detaillierteren Diskussion. Diese wird in Kap. V und VI gegeben.

Neben der Bildung von Dimeren in unpolaren Lösungsmitteln ist bei höheren Konzentration ($>10^{-2}$ mol l^{-1}) und insbesondere in schwer polarisierbaren Lösungsmitteln (z.B. aliphatische Kohlenwasserstoffe) die Bildung von selbstaggregierten Oligomeren möglich / 12/. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen ($<10^{-5}$ mol l^{-1} Chl a) kann die Bildung von Oligomeren jedoch ausgeschlossen werden /79/ / 66/.

2.3.2 Heteroaggregation von Chlorophyll a

In unpolaren Lösungsmitteln mit genügend hoher Konzentration polarer, insbesondere bifunktionaler Gruppen (z.B. Wasser, Alkohole) können sich unter geeigneten Präparationsbedingungen (tiefe Temperaturen) symmetrische (C_2) Chl a-Dimere, die über Liganden miteinander verbunden sind, bilden. Die Absorptionsspektren dieser Dimere ("Special Pairs") zeigen generell die rote Absorptionsbande im Bereich von 700 nm / 19/ / 79/ / 21/ und werden aus diesem Grunde als Modellsysteme für das P700 im Photosyntheseapparat der Grünen Pflanzen vorgeschlagen.

Die Positionen, an denen die bifunktionalen Liganden angreifen, sind das Mg-Zentralatom und eine der Ketogruppen. Katz et al. / 36/ sind der Meinung, daß auch in diesem Dimer die bindende Gruppe die Ketokarbonylfunktion am C_9 ist (s. a) in Abb. III.2(2)), während Fong et al. / 20/ die Bindung über die Ketogruppe am C_{10} (s. b.) in Abb. III.2(2)) für wahr-

scheinlicher halten. IR-Ansorptionsmessungen weisen jedoch darauf hin, daß die Bindung tatsächlich an der C₉ Gruppe angreift / 13/.

Die π -Ringsysteme der Chl a-Teilmoleküle liegen in einem Abstand, der eine relativ starke Wechselwirkung zuläßt, parallel zueinander.

Dies führt zu einer Erhöhung der Oszillatorenstärke gegenüber den selbstaggregierten Dimeren (s. Kap. III.2.2) / 65/.

Die Fluoreszenz dieser "Special Pair"-Dimere zeigt das Maximum bei 720 nm. Die Fluoreszenzlebensdauer beträgt ca. 4 nsec / 79/.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß zur chemischen Präparation eines Modellsystems für das PSII des Photosyntheseapparates aus selbstaggregierten Chl a-Dimeren (s. Kap. IV.1) die möglichst vollständige Freiheit der Lösung von Nukleophilen die unbedingte Voraussetzung ist.

IV. Experimentelles

1. Probenpräparation

1.1 Lösungsmittel

1.2 Chlorophyll a-Präparation

2. Absorptionsspektroskopie

2.1 Absorptionsspektrometer

2.2 Auswertung

3. Pikosekunden Fluoreszenzspektroskopie

3.1 Lasersystem

3.2 Zeitkorreliertes Photonen zählen

3.2.1 Versuchsaufbau

3.2.2 Meßverfahren

3.2.2.1 Fluoreszenzabklingkurven

3.2.2.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren

3.2.2.3 Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz

3.3. Auswertung

3.3.1 Übertragungsfunktion des Meß- systems

3.3.1.1 Zeitliches Verhalten

3.3.1.2 Spektrales Verhalten

3.3.2 Parameterextraktion (Fit)

1. Probenpräparation

1.1 Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden einer aufwendigen Trocknungsprozedur unterzogen, um Reste von Wasser und anderen Nukleophilen zu entfernen.

Dodecan (EGA-Chemie) wurde vor der Verwendung über Natrium-/Blei-Legierung getrocknet und destilliert. Anschließend wurde das Dodecan 24 h über frisch aktiviertem (24 h im Vakuum bei 600 K) Molekularsieb (3 Å, Riedel de Hæn) getrocknet und über ebenfalls frisch aktiviertem Molekularsieb aufbewahrt.

Cyclohexan wurde zunächst über Natrium getrocknet und anschließend über frisch aktiviertem Molekularsieb aufbewahrt. Tetrachlorkohlenstoff (Uvasol, Merck) wurde über frisch aktiviertem Molekularsieb getrocknet und aufbewahrt.

Sämtliche Glasgeräte, die mit Lösungsmitteln in Berührung kamen, wurden vor der Verwendung mindestens 24 h bei 370 K getrocknet und ausschließlich mit siliconfreiem Spezialfett (Fomblin, Montefluos) abgedichtet.

Wassersättigung der Lösungsmittel wurde durch Mischen mit Wasser und anschließender Ultraschallbehandlung erreicht.

1.2 Chlorophyll a-Präparation

Das Chl a wurde nach der Methode von Omata und Murata / 51/ aus frischem Spinat bzw. Grünkohl extrahiert. Grünkohl ergab eine etwas geringere Ausbeute an Chl a als Spinat, lieferte aber ansonsten - ebenso wie Spinat - Proben, die frei waren von Chl b, Phäophytinen und dem Stereoisomer Chl a'. Die frisch präparierten Proben wurden bis zur Verwendung unter Stickstoff bei 263 K aufbewahrt.

Die Proben wurden dünnschichtchromatographisch (reversed phase chromatography) auf ihre Reinheit hin überprüft / 63/.

Für die Messungen wurden die Proben in abschmelzbaren Quarz-fluoreszenzküvetten (Hellma) oder in verschraubbaren, mit einem Teflon/Viton-Septum versiegelten Küvetten aufbewahrt.

Chl a-Proben, die ohne polare Lösungsmittelanteile präpariert werden sollten, wurden in der Küvette im trockenen N_2 Strom durch mehrfache Kodestillation mit CCl_4 getrocknet / 4/. Anschließend wurde die Probe bei ca. 340 K im Vakuum getrocknet, mit der benötigten Menge Lösungsmittel aufgefüllt und - nach mehreren "freeze, pump, and thaw"-Zyklen zur Sauerstoffbefreiung - auf 77 K abgekühlt und die Küvette abgeschmolzen.

Bei Lagerung im Dunkeln bei Zimmertemperatur sind diese Proben gewöhnlich über mehrere Monate haltbar und zeigte keine spektralen Degenerationerscheinungen.

2. Absorptionsspektroskopie

Die Anteile von Chl a-Monomeren und -Dimeren in den verschiedenen Proben wurden durch Mehrkomponentenanalysen der Absorptionsspektren bestimmt / 1// 66/.

2.1 Absorptionsspektrometer

Ein handelsübliches Doppelstrahlabsorptionsspektrometer (UVI-KON 820; 20 cm Monochromator; Photomultiplier R446 Hamamatsu) diente in Verbindung mit einem Mikrocomputer System (ZILOG Z80) der Aufnahme der Absorptionsspektren. Für temperaturabhängige Messungen konnte die Küvette im Spektrometer im Bereich von 260 K bis 340 K auf ± 0.1 K temperiert werden.

2.2 Auswertung

Löst man Chl a in unpolaren Lösungsmitteln und fügt einige Volumenprocente 2-Propanol hinzu, so wird die Oszillatorenstärke des Chl a ausschließlich durch diese polaren Beimengungen bestimmt. Jeder Probe wurde nach den Messungen ein definierter Überschuß 2-Propanol zugegeben. Hierdurch konnte anhand des molaren Extinktionskoeffizienten bei 664.2 nm der Chl a-Monomere in 2-Propanol von $74\,400\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ / 64/ die Konzentration bestimmt werden und auf die ursprüngliche Nominalkonzentration zurückgerechnet werden.

Die Bestimmung des relativen Gehaltes an Chl a-Monomeren bzw. -Dimeren erfordert die Spektren der reinen Spezies. Da in den Proben immer beide Spezies vertreten sind und sich nur mehr oder weniger starke Überschüsse der einen oder anderen Art präparieren lassen, sind in den Absorptionsanalysen die Konzentrationen nur auf $\pm 1\%$ der Nominalkonzentration (d. h. Chl a-Eintrag) bestimmt / 12// 14/.

Hierbei wird das gemessene Absorptionsspektrum des Misch-

systems aus Monomeren und Dimeren als Linearkombination der Absorptionsspektren der Einzelkomponenten aufgefaßt. Im Bereich der Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes ist diese Annahme korrekt, d.h. solange - wie in den untersuchten Proben - die Konzentration der Chl a-Moleküle so gering ist, daß keine Wechselwirkung zwischen ihnen auftritt. Die gefundenen Koeffizienten geben die Konzentrationen der einzelnen Spezies wieder. Da das Gleichungssystem durch die Messung an vielen Wellenlängen überbestimmt ist, werden die Koeffizienten nach der Methode der kleinsten Quadrate auf dem Rechner optimiert.

3. Pikosekunden Fluoreszenzspektroskopie

3.1 Lasersystem

Für diese Arbeit wurde ein cw-gepumptes, aktiv modengekoppeltes Nd^{+3} :YAG Laser System (Spectra Physics 3000; Spectra Physics 342A) verwendet (s. Abb. IV.3.1(1)). Der Wirkungsgrad des "Mode Locker" Quarzkristalls wurde zusätzlich mit einer Regelungselektronik (Stab.: Spectra Physics 453) für die Treiberleistung des RF Generators I konstant gehalten.

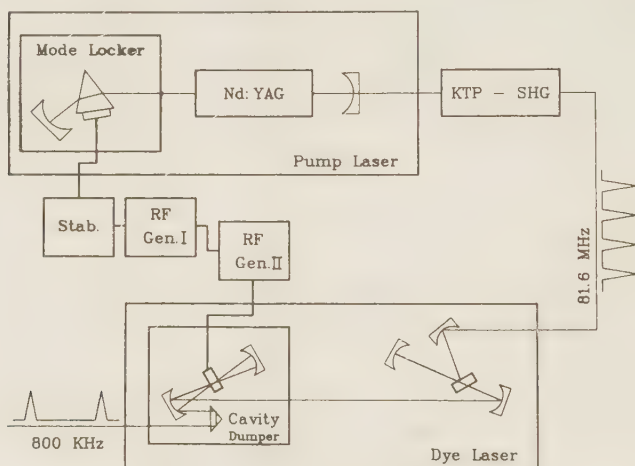


Abb. IV.3.1(1) Lasersystem zur Erzeugung von 10 psec Lichtpulsen mit frei wählbaren Wiederholraten; Beschreibung s. Text

Mit einem KTP-Kristall (Kalium-Titanil-Phosphat) wurde ein Teil des Laserlichtes von 1064 nm auf 532 nm konvertiert (Spectra Physics KTP-SHG).

Mit diesem Licht wurde ein Farbstofflaser (Spectra Physics Dye Laser 375B) mit verlängertem Resonator synchron gepumpt. Der verwendete Farbstoff war DCM. Mit einem 2-Platten Doppelbrechungsfilter konnte die Laserwellenlänge zwischen 600 nm und 700 nm abgestimmt werden.

Mit einem akusto-optischen Auskoppler (Spectra Physics Cavity Dumper 344S + RF Generator II) wurde die Pulsfolgefrequenz von 81.6 MHz auf 800 kHz reduziert. Das Unterdrückungsverhältnis war besser als 150:1.

Die Intensität des vertikal polarisierten Farbstofflaserlichtes schwankte um weniger als $\pm 7\%$ um einem Mittelwert von 10 mW (634 nm).

3.2 Zeitkorreliertes Photonenzählen

3.2.1 Versuchsaufbau

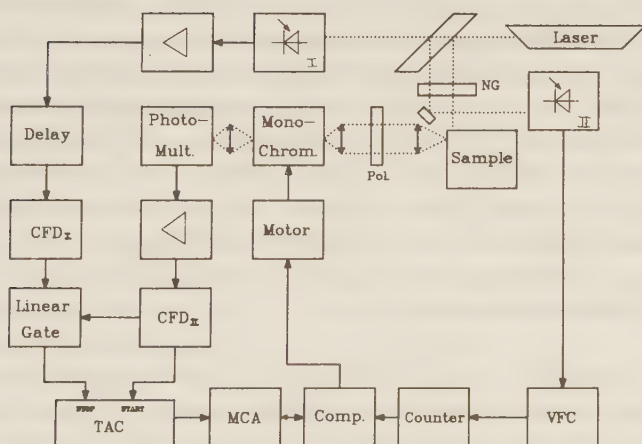


Abb. IV.3.2.1(1) Blockdiagramm des Versuchsaufbaus; Beschreibung s. Text

Der Versuchsaufbau (Abb. IV.3.2.1(1)) bestand aus drei logischen Einheiten:

- optischer Versuchsaufbau
- Nachweiselektronik
- Steuerelektronik

ad a) optischer Versuchsaufbau

Der synchron gepumpte Farbstofflaser (s. Kap. IV.3.1) wurde nur mit DCM betrieben und die gesamte verwendete Optik war auf den Betrieb im roten Wellenlängenbereich ausgelegt. Durch einen Strahlteiler gelangte 92 % des Laserlichtes auf die schnelle Fotodiode I (Amko Typ S171P). Der Reflex von der Vorderseite des Strahlteilers (4 %) gelangte, bei Bedarf durch ein Neutralfilter NG abgeschwächt, auf die Küvette in dem Thermostaten (Sample). Der Reflex von der Rückwand des Strahlteilerplättchens (4 %) wurde über einen Spiegel nach dem Durchgang durch das Neutralfilter auf ein Fotodioden-Lichtleistungsmeßgerät II (Spectra Physics 404) gelenkt. Das Fluoreszenzlicht der Probe wurde in 90° Anordnung über ein Tandemlinsenpaar ($f=50$ mm) auf den Eintrittsspalt eines Czerny-Turner Durchgangs-Monochromator (Spex Minimate; $f=22$ cm; 500 nm Blazewellenlänge) abgebildet. Im Fluoreszenzstrahl befand sich ein Folienpolarisator mit Teilkreishalterung (0.5° Auflösung). Der Austrittsspalt des Monochromators wurde mit einer Linse ($f=50$ mm) auf die Photokathode des Photomultiplier (Hamamatsu R955) abgebildet.

ad b) Nachweiselektronik

Das Signal der schnellen Photodiode I wurde um den Faktor 10 verstärkt (ESA Electronic VT110CH4) und über ein 50 Ω Koaxialkabel passender Länge verzögert auf den Constant-Fraction-Discriminator CFD I (Canberra 2129) gegeben. Der definierte Puls einer der beiden identischen Ausgänge des CFD I wurde zur Kontrolle des Lasers auf einen Zähler (im Bild nicht gezeigt; ORTEC 9315) gegeben. Der andere definierte Puls wurde an den Eingang eines Linear Gate (Uni. Oldenburg) gelegt. Die Signale des Photomultipliers wurden verstärkt (ESA Electronic VT110CH4) und mit dem CFD II (ORTEC 583) verarbeitet. Der Ausgangspuls dieses CFD wurde auf 100 ns Breite eingestellt und öffnete für diese Zeit das Linear Gate. Weiterhin wurde mit diesem Puls der TAC (Time Amplitude

Converter; ORTEC 457) gestartet. Der zugehörige Fotodiodenpuls konnte dann das Linear Gate passieren und gelangte auf den Stop-Eingang des TAC. Erfolgreiche Konvertierungen wurden gezählt (im Bild nicht gezeigt; ORTEC 772). Die dem gemessenen Zeitintervall proportionale Spannungsamplitude wurde von einem Wilkinson-ADC (Teil des MCA: Canberra 3521) digitalisiert. Der digitale Wert stellte die Adresse der Speicherzelle des Vielkanalanalysators MCA (Canberra 35+) dar. Deren Inhalt wurde um 1 erhöht.

Da der TAC nach erfolgreichem START ca. 10 μ s Totzeit hat, wurde, um eine hohe Repetitionsrate benutzen zu können, die Zeitachse invertiert, d.h. START- und STOP-Ereignis wie angegeben vertauscht. Um nun auch den STOP-Eingang (Photodiodensignal) nicht mit zu vielen Ereignissen zu beaufschlagen (Schwingneigung), wurde vor den STOP-Eingang das vom START-Signal getriggerte Linear Gate geschaltet. Diese Schaltung sicherte den optimal driftfreien Betrieb des von der Wandelrate stark abhängigen TAC.

ad c) Steuerelektronik

Der gesamte Speicher des MCA konnte von einem Mikrocomputer (Oettle & Reichler Z80) ausgelesen werden. Dieser Rechner steuerte weiterhin die MCA-Funktionen und den Schrittmotor für den Monochromator.

Ebenso wurde die Laserleistung mit dem Rechner überwacht. Hierzu wurde der Spannungsausgang des Fotodioden-Leistungsmeßgerätes II auf einen Spannungs-Frequenz-Wandler (Uni. Oldenburg, VFC) gegeben, dessen Frequenzausgang auf einen Zähler (Counter) gelegt wurde. Die Summe der Perioden stellte ein Maß für die Energie dar, die während der Meßzeit auf die Probe gefallen war.

Um reproduzierbare Messungen zu erhalten, mußte die Apparatur mindestens 1 h unter Meßbedingungen betrieben werden. Dies hatte seine Ursache im Wesentlichen in der Temperaturabhängigkeit des Übertragungsverhaltens der Elektronik. Der TAC zeigt nach dem Einschalten bis zum Zustand stabiler

thermischer Verhältnisse eine Drift von bis zu 100 mV entsprechend 225 ps.

3.2.2 Meßverfahren

Für die Messung von Fluoreszenzdynamiken von biologischen Proben im Bereich linearer Antwortfunktionen werden wegen der höchstzulässigen Photostromdichten während der Anregung ($2 \cdot 10^6 \text{ W cm}^{-2}$ / 29/), der z.T. geringen Quantenausbeuten und der relativ langen Abklingzeiten hochempfindliche Meßverfahren benötigt.

Die Proben wurden stets mit kleineren Leistungsdichten als 10^{18} Photonen $\text{cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ angeregt.

Eines der empfindlichsten Verfahren, das zudem auf der Zeitskala einen Anwendungsbereich von mehreren Größenordnungen (ca. 10 ps bis mehrere μs) abdeckt, ist das hier verwendete zeitkorrelierte Photonen zählen (TCPC = time correlated photon counting) / 71/.

Beim TCPC wird ein Kondensator ausreichender Kapazität C zwischen zwei zeitlich korrelierten Ereignissen mit einem konstanten Strom I geladen. Die Spannung U über dem Kondensator ist nach

$$U = \int_{t_1}^{t_2} I/C \, dt$$

dem Zeitintervall $t_1 t_2$ proportional. Für stochastische Zeitintervalle wird, wenn mit dem Analog-Digital-Converter (ADC) deren korrespondierende Spannungen gemessen werden, mit einer genügend großen Anzahl von Messungen die Verteilungsfunktion der Zeitintervalle bestimmt.

3.2.2.1 Fluoreszenzabklingkurven

Es sei t_1 der mit der Photodiode gemessene Zeitpunkt der Anregung eines Ensembles von Molekülen und t_2 , der mit dem Photomultiplier detektierte Zeitpunkt der Emission eines Fluoreszenzphotons. Für genügend viele Meßereignisse reproduziert die Verteilungsfunktion der Zeitintervalle $t_1 t_2$ die Abklingfunktion der Fluoreszenzintensität. Dies setzt voraus, daß in dem beobachteten Zeitintervall nur ein Fluoreszenzphoton detektiert wird. Von mehreren Photonen würde stets nur das erste detektiert werden, was eine Überhöhung des Anfangsteiles ("pile up") der Verteilungsfunktion zur Folge hätte. Für einen monoexponentiellen Zerfall gilt für die Anzahl der nachgewiesenen Fluoreszenzphotonen N in einem Zeitintervall zur Zeit t / 16/

$$N(t) = A \exp(-u(1-\exp(-t/\tau))) \exp(-t/\tau)$$

wobei A eine Proportionalitätskonstante und u die mittlere Anzahl von Fluoreszenzphotonen, die nach der Anregung am PMT ankommen, sind.

Die Abweichung vom monoexponentiellen Zerfall ist für $u \leq 0.01$ praktisch zu vernachlässigen (siehe Abb. 3.2.2.1(1)).

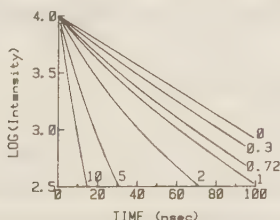


Abb. 3.2.2.1(1) Rechnersimulation für den "pile up" Effekt beim TCPC; Parameter ist die mittlere Anzahl u von Photonen aus einen monoexponentiellen Zerfall, die nach pulsförmiger Anregung im Nachweiszeitintervall eintreffen; entnommen aus / 16/

Die Pulswiederholffrequenz des Lasers war 800 kHz und die Wandelrate des TAC lag nie über 8 kHz, sondern typisch bei 3 kHz, so daß u immer kleiner als 0.01 war.

Die zeitliche Breite des gesamten Meßfensters war 25 ns, die Anzahl der Kanäle in diesem Meßfenster war 1024, so daß eine Auflösung von 24.4 ps pro Kanal gegeben war.

Die Meßdauer wurde so gewählt, daß im Maximum der Kurve mindestens 10 000 Ereignisse gezählt worden waren. Dies bedeutet eine zu erwartende Standardabweichung von 1%, da die statistische Streuung einer Poisson-Verteilung entspricht.

Die Kurven wurden auf die mittlere Anregungsintensität während der Messung und die Meßzeit selbst normiert. Die benötigte Meßzeit wurde hierzu um die Totzeit des ADC bereinigt, um die tatsächliche Meßzeit zu ermitteln.

3.2.2.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren

Mit dem Versuchsaufbau aus Kap. IV.3.2.1 wurden auch zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren gemessen. Hierzu wurden an verschiedenen Wellenlängen Fluoreszenzabklingkurven (s. Kap. IV.3.2.2.1) aufgenommen. Diese Kurven wurden dann während der Messung im Rechner zu 5 Meßwerten (Abb. IV.3.2.2.2(1)) zusammengefaßt. Jeder Meßwert F_i wurde entsprechend

$$F_i = \sum_{n=T_{i-1}}^{T_i} K_n \quad ; i = 1, 2, \dots, 5$$

aus der Summe der Inhalte der Kanäle K_n des MCA gebildet. Tabelle IV.3.2.2.2(1) gibt die zeitliche Lage der Intervallgrenzen T_i bezogen auf das Maximum der Übertragungsfunktion, die Intervallbreiten B_i und Schwerpunktzeiten $\langle T_i \rangle$ der Zeitintervalle an.

F_i	!	T_{i-1}	!	T_i	!	B_i	!	$\langle T_i \rangle$
	!	ps	!	ps	!	ps	!	ps
F_1	!	-510	!	255	!	765	!	-127
	!		!		!		!	
F_2	!	255	!	1020	!	865	!	638
	!		!		!		!	
F_3	!	1020	!	2040	!	1020	!	1560
	!		!		!		!	
F_4	!	2040	!	4080	!	2040	!	3060
	!		!		!		!	
F_5	!	8925	!	11985	!	3060	!	10455
	!		!		!		!	

Tab. IV.3.2.2.2(1) Intervallgrenzen T_i , Intervallbreiten B_i und Schwerpunktslage $\langle T_i \rangle$ der Meßfenster der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren

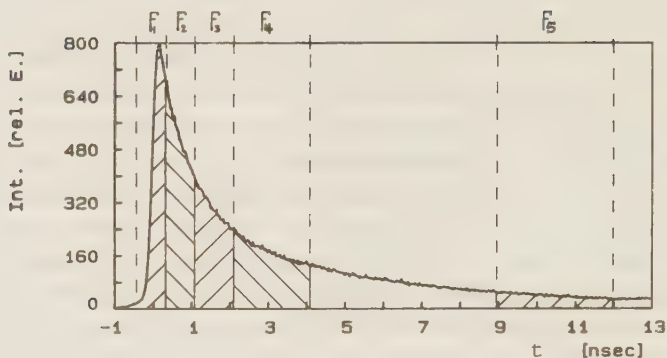


Abb. IV.3.2.2.2(1) Aufteilung der Meßzeitintervalle der zeit-
aufgelösten Fluoreszenzspektren am Beispiel der
Fluoreszenz von $(\text{Chl})_2$ Dimeren in Dodecan

Die Spektren wurden auf die spektrale Empfindlichkeit der
Apparatur korrigiert.

Abb. IV.3.2.2.2(1) zeigt die Meßfenster am Beispiel einer
typischen Abklingkurve bei einer festgehaltenen Emissions-
wellenlänge.

Enthält die Fluoreszenz einer Probe Komponenten mit deutlich
unterschiedlichen Abklingzeiten, kann man die Spektren der
einzelnen Komponenten separieren. Durch Analyse der Zerfalls-
funktion bestimmt man zunächst die Zeitkonstante der lang-
lebigsten Komponente. Diese Bestimmung ist gewöhnlich sehr
exakt, da die Einflüsse der kurzen Komponenten gegen Ende der
Zerfallsfunktion bereits abgeklungen sind und der restliche
Zerfall monoexponentiell ist.

Die Anteile der kurzlebigen Komponenten in den verschiedenen
zeitaufgelösten Spektren F_i lassen sich nun durch anteilige
Subtraktion des Spektrums der langlebigen Komponente, das man
durch Messung der Fluoreszenz am Ende der Zerfallszeit be-
stimmt hat (F_5), gewinnen.

Die Fluoreszenzspektren F_i in den Zeitfenstern $i=1,2,\dots,5$
sind

$$F_i(\lambda) = \int_{T_{i1}}^{T_{i2}} F(t, \lambda) dt$$

wobei die T_{ij} die jeweiligen Intervallgrenzen der Zeitfenster i (s. Tab. IV.3.2.2.2(1)) darstellen.

Durch die Messung der Abklingfunktion der Fluoreszenz $F(t, \lambda_n)$ an den Wellenlängen λ_n (668 nm, 672 nm und 685 nm) kann die Zeitfunktion in einen schnell abklingenden Anteil $F_s(t, \lambda_n)$ und eine langsame Komponente $F_l(t, \lambda_n)$ separiert werden

$$F(t, \lambda_n) = F_s(t, \lambda_n) + F_l(t, \lambda_n)$$

wobei die Zeitfunktion der langsamen Komponente durch eine Exponentialfunktion gegeben ist, so daß

$$F_l(t, \lambda_n) = F_l(\lambda_n) e^{-t/\tau_l}$$

Für die gefundenen Werte für die Lebensdauern und Amplituden gilt aber für genügend große T_{ij} , daß

$$F_s(T_{ij}, \lambda_n) \ll F_l(\lambda_n) e^{-T_{ij}/\tau_l}$$

da mit hinreichender Genauigkeit $F_s(t, \lambda_n)$ als

$$F_s(t, \lambda_n) = F_k(t, \lambda_n) e^{-t/\tau_k} + F_m(t, \lambda_n) e^{-t/\tau_m}$$

dargestellt werden kann, wobei τ_k typisch kleiner 150 ps und τ_m typisch 1 ns ist gegenüber τ_l von ca. 6 ns (s. Kap. VI).

Im Zeitfenster F_5 mit den Intervallgrenzen $T_{51} = 8.925$ ns und $T_{52} = 11.985$ ns wird also

$$F_5(\lambda) = \int_{T_{51}}^{T_{52}} F(t, \lambda) dt \approx F_l(\lambda) \int_{T_{51}}^{T_{52}} e^{-t/\tau_l} dt$$

somit läßt sich nach der Integration die langlebige Komponente in den zeitaufgelösten Spektren F_i ($i \neq 5$) durch einfache Subtraktion eliminieren. Der Proportionalitätsfaktor ζ , mit dem das F_5 -Spektrum vor der Subtraktion multipliziert werden muß errechnet sich aus

$$\zeta = \frac{(e^{-T_{i1}/\tau_1} - e^{-T_{i2}/\tau_1})}{(e^{-T_{51}/\tau_1} - e^{-T_{52}/\tau_1})}$$

und man erhält mit

$$F_s(\lambda) = F_i(\lambda) - \zeta F_5(\lambda)$$

die Spektren der kurzlebigen Komponenten.

3.2.2.3 Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz

Im betrachteten Zeitbereich der Fluoreszenzabklingfunktionen sind starke Einflüsse durch die Anisotropie der Fluoreszenz gegeben, bedingt durch Photoselektion während der Anregung durch polarisiertes Licht. Zur Messung dieser Anisotropie und deren zeitlichen Zerfalls wurden zeitlich hintereinander Fluoreszenzabklingdauer-messungen (Kap. IV.3.2.1) bzw. zeitaufgelöste Spektren (Kap. IV.3.2.2) mit parallelem (I_p) und senkrechtem (I_s) Analysator aufgenommen.

Für Messungen der reinen, von Depolarisationseffekten nicht berührten, Fluoreszenzabklingfunktionen wurde der Analysator auf den "magischen Winkel" (54.7°) eingestellt.

Die Anisotropie r ist definiert als

$$r = \frac{I_p - I_s}{I_p + 2I_s} \quad (\text{IV.}(1))$$

und hat nur für vollständig parallel zur Anregungspolarisation polarisiertes Licht, wie zum Beispiel Streulicht, den Wert 1. Um die Polarisation der Fluoreszenz von Molekülen in Lösung zu analysieren, bedarf es zunächst einiger Überlegungen.

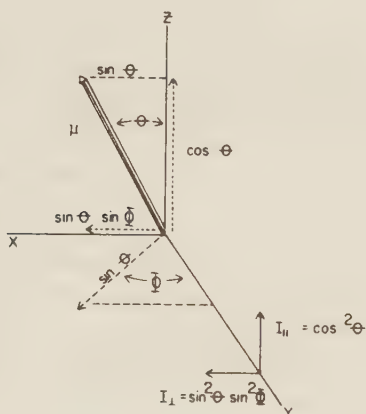


Abb. IV.3.2.2.3(1) Übergangsdipolmoment μ eines Moleküls im Laborkoordinatensystem

Die gesamte Fluoreszenz $F(t)$ setzt sich zusammen aus

$$F(t) = F(t) [\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2]$$

wobei die μ_i die Quadrate der Projektionen des Einheitsvektors des Emissionsdipolmoments auf die Koordinatenachsen x, y und z sind. Wegen der Isotropie der Anregung in ϕ ist die Intensität in x -Richtung und y -Richtung gleich, so daß die Zeitfunktion der Gesamtintensität nur noch eine Funktion von θ ist und mit zwei orthogonalen Messungen I_p und I_s (Polarisator auf der y -Achse) bestimmt werden kann

$$\begin{aligned} I_p &= F(t) \mu \cos^2 \theta \\ I_s &= F(t) \mu \sin^2 \theta \end{aligned}$$

Wird der Polarisator gegen die z-Achse um einen Winkel α gedreht, so gilt mit $\mu = 1$:

$$F(\alpha, t) = I_p \cos^2 \alpha + 2 \sin^2 \alpha$$

Es wird nur $F(\alpha, t) = F(t)$ dann, wenn

$$2 \sin^2 \alpha = \cos^2 \alpha$$

d. h. $\alpha = 54.7^\circ$ (Magischer Winkel) ist. Unter diesem Winkel wird die Abklingfunktion der Fluoreszenz mit einer einzigen Messung unabhängig von der Orientierung der emittierenden Dipole bestimmt.

Die zeitliche Entwicklung der Polarisationsanisotropie einer Lösung mit emittierenden Dipolen μ ergibt sich nach / 84/ / 85/, wenn man zunächst die Wahrscheinlichkeitsverteilung $W(\theta, \phi, t)$ der Orientierung dieser Dipole für $t = 0$ betrachtet. Wegen der Isotropie in ϕ bei der Anregung parallel zur z-Achse gilt für die Anfangsverteilung $W(\theta, \phi, 0)$

$$W(\theta, \phi, 0) = 1/4 (1 + 2 P_2(\cos \theta))$$

wobei $P_2(\cos \theta)$ das Legendrepolynom 2. Ordnung ist. Nimmt man zunächst an, daß die Richtung des Absorptionsdipolmomentes gleich der des Emissionsdipolmomentes ist, wird die zeitliche Entwicklung der Verteilungsfunktion einfach durch deren Green'sche Funktion $G(\theta_0, \phi_0 | \theta, \phi, t)$ gegeben. Entwickelt man G nach Kugelfunktionen

$$G(\theta_0, \phi_0 | \theta, \phi, t) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l c_{l,m}(t) Y_{l,m}(\theta_0, \phi_0) Y_{l,m}^*(\theta, \phi)$$

mit den zeitabhängigen Entwicklungskoeffizienten $c_{l,m}(t)$, gewinnt man die Verteilungsfunktion $W(\theta, \phi, t)$ durch

$$W(\theta, \phi, t) = \int_0^{2\pi} d\phi_0 \int_0^{\pi} \sin\theta_0 d\theta_0 W(\theta, \phi, 0) G(\theta_0, \phi_0 | \theta, \phi, t)$$

Nach Ausführung der Integration erhält man

$$W(\theta, \phi, t) = 1/4 (1 + 2 c_{2,0}(t) P_2(\cos \theta))$$

wobei $c_{2,0}(0) = 1$ ist.

Um die Zeitabhängigkeit der Intensitäten in I_p und I_s (s.o.) zu erhalten, müssen die mit $W(\theta, \phi, t)$ gewichteten Emissionen über den ganzen Raumwinkel integriert werden und man erhält nach der Integration

$$I_p(t) = (1/3 + 4/15 c_{2,0}(t)) F(t)$$

$$I_s(t) = (1/3 - 2/15 c_{2,0}(t)) F(t)$$

Läßt man nun zu, daß Absorptionsdipolmoment und Emissionsdipolmoment einen Winkel ξ bilden, erhält man die Verteilung der Orientierungswahrscheinlichkeit

$$W(\theta, \phi, t) = 3/(4\pi) \cos^2\theta_0 P_2(\cos\xi) + 3/(4\pi) (\sin^2\xi)/2$$

und für die orthogonalen Intensitätskomponenten nach der entsprechenden Integration

$$I_p(t) = P_2(\cos\xi) (1/3 + 4/15 c_{2,0}(t)) F(t) + ((\sin^2\xi)/2) F(t)$$

$$I_s(t) = P_2(\cos\xi) (1/3 - 2/15 c_{2,0}(t)) F(t) + ((\sin^2\xi)/2) F(t)$$

Setzt man dies in die Definitionsgleichung für die Fluoreszenzanisotropie (Gl. IV.(1)) ein, erhält man

$$r(t) = 2/5 P_2(\cos\xi) c_{2,0}(t) \quad (\text{IV.}(2))$$

Hiermit kann der Winkel ξ zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment bestimmt werden, wenn r_0 bei $t = 0$ gemessen

worden ist

$$\xi = \arccos \frac{5 r_0 + 1}{3} \quad (\text{IV. (3)})$$

Sind insbesondere Emissionsdipolmoment und Absorptionsdipolmoment kollinear, so erhält man den maximalen Zahlenwert für die Anfangsanisotropie $r_0 = r(0)$ der Fluoreszenz von Molekülen in Lösungen

$$r_0 = 0.4$$

Stehen beide Dipole aufeinander senkrecht, erhält man den Minimalwert für r_0 in Lösungen:

$$r_0 = - 0.2$$

Aus der klassischen hydrodynamischen Beschreibung der Diffusion eines starren Ellipsoids in einer Flüssigkeit erhält man im allgemeinen Fall für die $c_{2,0}(t)$ aus Gl.(VI.(2)) eine Summe aus 5 Exponentialfunktionen und somit für $r(t)$

$$r(t) = 2/5 P_2(\cos \xi) \sum_{i=1}^5 \beta_i e^{-(t/\phi_i)}$$

wobei die Koeffizienten β_i und ϕ_i Funktionen der Molekülkoordinaten und des Diffusionstensors $\mathbf{D}$ sind / 84/.

Für den einfachsten Fall einer rotierenden Kugel wird $\mathbf{D}$ ein Skalar und durch die Einstein'sche Beziehung

$$6 D = (k T) / (V \eta)$$

wiedergegeben.

Die Zeitfunktion der Rotationsdepolarisation der Fluoreszenz ist dann durch eine einzige Exponentialfunktion gegeben

$$r(t) = 2/5 P_2(\cos \xi) e^{-6Dt}$$

Aus der gemessenen Depolarisationszeitkonstante ϕ kann dann das effektive Volumen V des fluoreszierenden Moleküls berechnet werden

$$V = (k T) / (n \phi) \quad (\text{IV.}(4))$$

Für Moleküle mit bevorzugten Rotationsachsen ("oblate" = scheibenförmig) kann man zeigen, daß deren Anisotropiezerfall ebenfalls durch eine monoexponentielle Depolarisationsfunktion beschrieben werden kann / 85/.

Für die Anisotropien $r_i(t)$ der Fluoreszenz F_i unterschiedlicher Molekülsorten i -gemessen an der gleichen Wellenlänge-gilt für die mittlere, gemessene Anisotropie $r(t)$

$$r(t) = \frac{\sum F_i(t) r_i(t)}{\sum F_i(t)} \quad (\text{IV.}(5))$$

Man kann also bei zwei orthogonalen Dipolmomenten der Absorptionsübergänge in einem Molekül (z.B. für Chl $\underline{a}$ Q_y , Q_x), deren Emission aber aus nur einem Zustand (Q_y) erfolgt, den relativen Anteil I_x der Beimischung des dazu orthogonalen Zustands (Q_x) in Absorption berechnen:

$$I_x = 1 - \frac{r - r_x}{r_y(1 - r_x/r_y)} \quad (\text{IV.}(6))$$

wobei r die gemessene Anisotropie ist und r_y die Anisotropie des reinen Q_y Übergangs bei resonanter Anregung ist und r_x aus der Orthogonalität der Dipolmonente berechnet werden kann.

3.3 Auswertung

3.3.1 Übertragungsfunktion des Meßsystems

Die Auswertung der gewonnenen Fluoreszenzdaten wurde auf einem Mikrocomputer (Oettle & Reichler Z80) vorgenommen. Da die Relaxationszeiten zum Teil im Bereich der Halbwertsbreite der Übertragungsfunktion $H(t)$ des Meßsystems lagen, mußte berücksichtigt werden, daß nicht die reine Fluoreszenzabklingfunktion $Y(t)$ der betrachteten Moleküle gemessen wurde, sondern deren Faltungsprodukt $G(t)$:

$$G(t) = H(t) * Y(t) \quad (\text{IV.}(6))$$

Um $Y(t)$ zu bestimmen müßte man $G(t)$ "entfalten". Dies könnte zum Beispiel dadurch geschehen, daß man die Fouriertransformierte von $G(t)$ durch die Fouriertransformierte von $H(t)$ dividiert und das Ergebnis zurück transformiert. Wegen des relativ starken Rauschanteils gerade im Bereich der hohen Fourierkomponenten (entsp. kurzen Zeiten) wäre durch die doppelte Transformation und die Division die Signifikanz des Ergebnisses relativ gering.

Erfolgreicher ist die Methode der iterativen Rekonvolution. Bei dieser Methode wird eine Schätzung von $Y(t)$ mit der Impulsantwort $H(t)$ entsprechend Gl. IV.(6) gefaltet und das Ergebnis mit der Messung verglichen. Dies wird für verschiedene Schätzungen solange wiederholt, bis eine befriedigende Übereinstimmung erzielt ist.

Man benötigt hierzu jedoch möglichst exakt die Übertragungsfunktion $H(t)$ des Meßsystems. In einem linearen System mißt man hierzu die Antwortfunktion $H'(t)$ auf eine möglichst deltaimpulsförmige Anregung $D'(t)$ des System (z.B. durch Streulicht)

$$H'(t) = H(t) * D'(t)$$

Da die Halbwertsbreite des Laserpulses stets kleiner als 10 ps ist, gilt auf dem betrachteten Zeitmaßstab in guter

Näherung

$$H'(t) = H(t)$$

Gl. IV.(6) gilt nur dann, wenn es sich um ein lineares System handelt.

Bei dem TCPC-Meßverfahren liegt eine diskrete Zeitachse T_i vor

$$T_i = \sum_{n=0}^i \kappa_n \langle t \rangle$$

wobei $\langle t \rangle$ das mittlere Zeitintervall ($= 1$ Kanal im MCA) angibt. Auf einer linearen Zeitskala sind die Faktoren κ_n gleich für alle n . Ein TCPC-System hat jedoch zwei Stellen, an denen Nichtlinearitäten in der Zeitachse auftreten können: erstens den TAC durch Nichtlinearitäten in der Ladekurve des Kondensators bzw. des Endverstärkers (s. Kap. IV.3.2.1) und den ADC durch Nichtlinearität der Kennlinie. Im TAC sind die κ_n eine Funktion von n , d.h. das Zeitintervall $d\Delta$ das zu einer Spannungsänderung dU am Ausgang führt hängt vom Abstand zum Zeitsprung ab. Mit der Nichtlinearität des ADC gilt also

$$\kappa_n = \frac{d\Delta}{dU} \cdot \frac{dU}{dt} = \frac{d\Delta}{dt}$$

Die Faktoren κ_n (Kennlinie) sind zu bestimmen. Mit diesen Faktoren läßt sich die Meßkurve in einen linearen Zeitraum transformieren.

Hierzu wurde die Kennlinie von ADC und TAC dadurch bestimmt, daß gleichverteilte Zufallszeitintervalle auf TAC und ADC gegeben wurden (START durch Pulsgenerator, STOP durch Rauschsignale des PMT; START und STOP sind nicht korreliert, es ist von Gleichverteilung der Intervall-Längen auszugehen). Die erwartete Kurve ist eine Parallele zur Zeitachse.

Abweichungen (s. Abb. IV.3.3(1)) von der Parallelen stellen die unterschiedliche Zeitäquivalente κ_n für die einzelnen MCA-Kanäle dar.

Besonders starke Abweichungen zeigen Analog-Digitalwandler nach dem "successive approximation"-Prinzip, weshalb ein "Wilkinson"-ADC verwendet wurde, dessen Übertragungsfunktion nahezu linear ist.

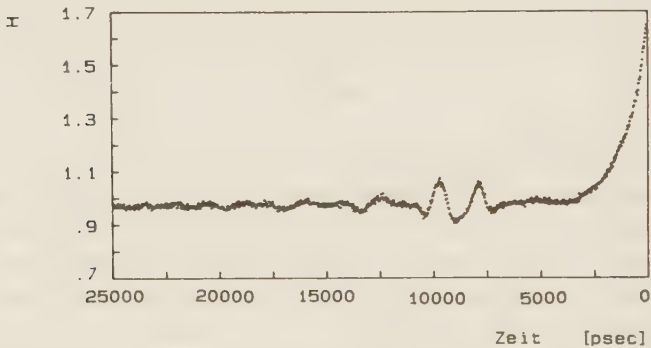


Abb. IV.3.3(1) Verteilungsfunktion H der Ausgangspulshöhen des ORTEC 457 TAC bei Beaufschlagung mit gleichverteilten Start-Stop-Zeitintervallen; invertierte Zeitachse

Die gemessene Nichtlinearität des TAC im Anfangsteil des höchsten Auflösungsbereiches (50 ns) wurde dadurch verringert, daß die halbe Maximalspannung ($= -5$ V) als Vorspannung an den Ausgangsverstärker des TAC gelegt wurde und gleichzeitig die Ausgangsauflösung um den Faktor 2 vergrößert wurde. Hierdurch wurde die zweite Hälfte des 50 ns-Zeitfensters auf den Spannungs-Bereich von 0 V bis 10 V und damit auf die 1024 Meßkanäle abgebildet. Im Meßbereich ab 20 000 ps bleibt die Verteilungsfunktion H praktisch konstant.

3.3.1.1 Zeitliches Verhalten

Die Impulsantwort des Meßsystems lag typisch bei ca. 250 ps FWHM; hierbei wurden Spalte von 0.25 mm verwendet.

Die Breite der Impulsantwort wird hauptsächlich durch die folgenden Parameter beeinflusst:

"Jitter" von TAC, CFD I und II und MCA: <30 ps

"Jitter" des Photodiodensignals : <50 ps

"Jitter" PMT - Pulses : <100 ps

laterale Bildausdehnung auf der
Photokathode (s. Abb. IV.IV.(6)) ca. 150 ps/mm

zeitl. Dispersion durch das Gitter
des Monochromators ca. 100 ps

Die präzise Abbildung des Austrittspaltes des Monochromators auf den Bereich des rechten Drittels der Photokathode ergibt die zeitlich beste Auflösung (Kurve 5 in Abb. IV.3.3.1(1)). Die unterschiedliche Form der Übertragungsfunktionen - entsprechend der Position des Spaltbildes auf der Photokathode - ist auch der Grund, warum bei monochromem Licht (wie z.B. Laserstreulicht) die Antwortfunktion stark von der Stellung des Monochromators, d.h. von der symmetrischen Ausleuchtung des Austrittsspalt) abhängt. Deshalb wurde die Impulsantwort des Systems sowohl durch Streulicht an BaTiO_4 als auch mit dem Fluoreszenzlicht von DQTCI (1,3'-Diethyl-4,2'-Quinolythiacarbocyanin Iodid) in Methanol ($\tau = 53 \text{ ps} / 86/$) bestimmt (Abb. IV.3.3.1(2)). Die Reproduzierbarkeit der Lage des Maximums der Übertragungsfunktion war so besser als 25 ps.

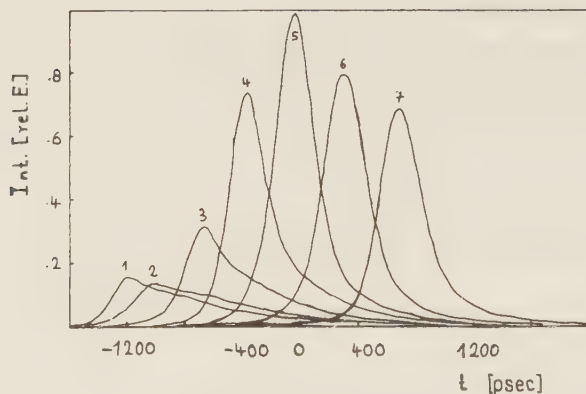


Abb. IV.3.3.1(1) Abhängigkeit der Form der Übertragungsfunktion von der Lage des Monochromatorspaltbildes auf der Photokathode des R955 Photomultipliers; die Bildlage verschiebt sich von Kurve zu Kurve lateral um 1 mm

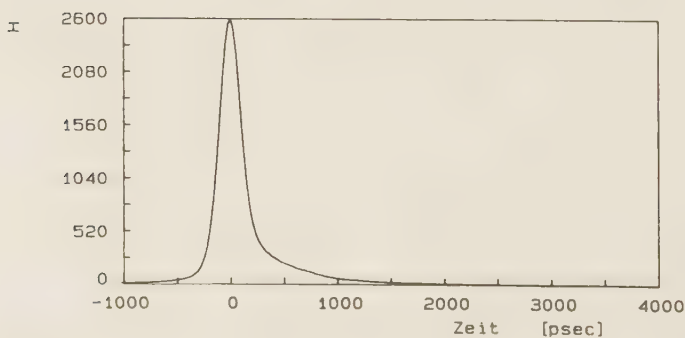


Abb. IV.3.3.1(2) Impulsantwort des TCPC Meßsystems gemessen mit BaTiO_4 in Glycerol; Bildlage wie Kurve 5 in Abb. IV.3.3.1(1)

Vor und nach jeder Fluoreszenzmessung wurde die Impulsantwort des Systems bestimmt und für die Auswertung (s. Kap. IV.3.3.2) herangezogen.

3.3.1.2 Spektrales Verhalten

Bei Messung der Impulsantwort mit Streulicht muß man bei großen Unterschieden in der Photonenenergie von Anregungslicht (Streulicht) bzw. Fluoreszenzlicht mit einer zeitlichen Verschiebung der Impulsantwort auf Grund unterschiedlicher Austrittsenergie der Elektronen aus der Photokathode und damit verbundener unterschiedlicher Transitzeit durch den PMT rechnen. Sie beträgt ca. 0.19 ps nm^{-1} / 87/.

Mit einer Wolframbandeichlampe wurde die spektrale Übertragungsfunktion des Systems für beide Polarisationsrichtungen und dem "magischen Winkel" gemessen und die Fluoreszenzspektren wurden entsprechend korrigiert.

Streulicht des Anregungslasers wurde bei 0.25 mm Spaltbreite des Monochromators im Abstand von 5 nm von der Anregungswellenlänge auf 0.02% und im Abstand von 10 nm auf 0.001% unterdrückt.

3.3.2 Parameterextraktion (Fit)

Bei bekannter Impulsantwort $H(t)$ wird durch iterative Rekonvolution die beste Schätzung $S(t)$ für die wahre Fluoreszenzabklingfunktion $Y(t)$ gesucht. Bewertungskriterium ist die Summe $X(p_i, \tau_i)$ der gewichteten Abstandsquadrate zwischen Meßkurve $Y(t)$ und Fit $F(t, p_i, \tau_i)$, die für einen Satz von Parametern p_i und τ_i minimal sein soll.

$$X(p_i, \tau_i) = \sum_{t=1}^n w^2(t) (Y(t) - F(t, p_i, \tau_i))^2$$

Hierbei ist die Wichtungsfunktion $w(t)$ durch die Poissonstatistik der Photonen $Y(t)$, die in einem Zeitintervall t nachgewiesen werden, für genügend große n gegeben:

$$w(t) = (Y(t))^{-1/2}$$

Der Parametersatz p_i, τ_i beschreibt die vermutete analytische Funktion $F(t, p_i, \tau_i)$ vollständig. Bei nichtlinearen Ansätzen für $F(t, p_i, \tau_i)$ wie in dem hier gemachten Multiexponentialansatz

$$F(t, p_i, \tau_i) = \sum_{i=1}^k p_i \exp(-t/\tau_i)$$

kann das Minimum für $X(p_i, \tau_i)$ nicht direkt ausgerechnet werden, sondern muß iterativ gesucht werden. Diese Optimierungsprozedur für einen Parametersatz p_i und τ_i wurde durch einen modifizierten Marquart-Algorithmus / 16/ durchgeführt.

Für jeweils einen Satz von nichtlinearen Parametern τ_i , der aus einer Schätzung oder einem vorhergehenden Fit stammen kann, werden die linearen Parameter p_i direkt, wegen der Minimalisierungsbedingung

$$\frac{\partial X}{\partial p_i} = 0$$

durch Lösung des entstehenden Linearen Gleichungssystems berechnet.

Im nächsten Schritt wird um die Anfangsschätzung von τ_i eine Taylorreihe entwickelt, die nach dem ersten Glied abgebrochen wird. Das lineare Glied wird dann wiederum nach der Methode der Kleinsten Quadrate optimiert. Mit der neugewonnenen Schätzung für die nichtlinearen Parameter τ_i wird ein neuer Satz der linearen Parameter p_i errechnet, mit dem man wieder von neuem in das Verfahren eintritt, bis ein geeignetes

Abbruchkriterium für diese Prozedur erfüllt ist.

Durch geeignete Gewichtung der Diagonalelemente (Marquart-verfahren) der Lösungsmatrix, die man bei der Lösung des Gleichungssystems der linearisierten Form des Optimierungsproblems erhält, erreicht man, daß weit entfernt vom Minimum der Fehlerfunktion $X(p_i, \tau_i)$ das Verfahren im wesentlichen nach der schnelleren Gradientenmethode und in der Nähe des Minimums von $X(p_i, \tau_i)$ nach dem quadratisch konvergierenden Gauß-Newton-Verfahren arbeitet.

Zur Beurteilung der Güte des Fits (z.B. bzgl. systematischer Fehler) wird der Verlauf der Kurve der gewichteten Residuen, die gleichverteilt um Null liegen sollten, herangezogen. Das reduzierte χ^2 - Kriterium liefert hierfür ein Maß / 88/:

$$\chi^2 = 1 / (n - i - 1) \sum_{t=1}^n (F(t) - Y(t))^2 / Y(t)$$

wobei t die Meßkanäle von 1 bis n durchzählt. Die Statistik der Meßpunkte beim TPC entspricht der einer Poisson-Verteilung, somit sollte die Summe der Quotienten aus den Residuen und der erwarteten Standardabweichung σ^2 im Mittel 1 sein; die χ^2 - Verteilung gibt die Wahrscheinlichkeit bei bekannter Anzahl von Stichproben dafür an, daß bei gegebenen Fitparametern in einer weiteren Messung ein χ^2 -Wert gefunden wird, der größer ist als der Ausgangswert. Mit zunehmender Kanalzahl wird diese Verteilung um 1 herum immer schmaler. Bei einer guten Fitparameterwahl sollte die Wahrscheinlichkeit, daß der nächste χ^2 -Wert größer ist als der alte 0.5 betragen. Ein Fit wurde verworfen, wenn die Wahrscheinlichkeit für ein größeres χ^2 kleiner als 0.3 war (d.h. χ^2 (500 Kanäle)=1.1), und auch dann, wenn die optische Kontrolle der Residuen ebenfalls einen Hinweis auf systematische Fehler gab.

V. Messungen an Chlorophyll a-Lösungen

1. Absorptionsmessungen von Chlorophyll a-Lösungen in Dodecan
 - 1.1 Monomere
 - 1.2 Dimere
2. Fluoreszenzmessungen von Chlorophyll a-Lösungen in Dodecan
 - 2.1 Monomere
 - 2.2 Dimere
3. Polarisationsanisotropiemessungen der Fluoreszenz von Chlorophyll a-Lösungen in Dodecan
 - 3.1 Monomere
 - 3.2 Dimere

1. Absorptionmessungen von Chlorophyll a in Dodecan

1.1 Monomere

Abhängig von den jeweiligen Präparationsbedingungen enthalten die Chl a-Lösungen in unpolaren Lösungsmitteln (hier Dodecan) auch unterschiedliche Mengenanteile an Wasser. Hierdurch wird die Zusammensetzung der Lösung aus Chl a-Monomeren (Chl*L) und -Dimeren (Chl)₂ entscheidend bestimmt.

Um das Absorptionsspektrum der Chl a-Monomere in Dodecan zu gewinnen, müssen relativ hohe Überschüsse (s. Kap. VI.1.2) von Nukleophilen im Dodecan vorhanden sein. Da bei Zimmertemperatur die Sättigungskonzentration für Wasser in Dodecan nur $6.1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ist, kann vollständige Bildung von Monomeren nur bei so starken Verdünnungen ($C_N < 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a) erreicht werden, daß keine einfache absorptionsspektrometrische Messung mehr möglich ist. Der Extinktionskoeffizient im Maximum ist dann kleiner als 10^{-3} . Zur Darstellung der Chl a-Monomere in Dodecan wurden deshalb Lösungen mit $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ 2-Propanol (= Isopropanol IP) als Nukleophil und $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a präpariert. IP ist mit Dodecan in jedem Verhältnis mischbar.

Abb. V.1(1) zeigt das entsprechende, auf 1 mol l^{-1} umgerechnete Absorptionsspektrum des (Chl*IP) bei 300 K.

Das Absorptionsmaximum des $Q_y(0,0)$ Übergangs liegt bei 662 nm und hat einen molaren Extinktionskoeffizienten von $90\,900 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Variiert man die Temperatur einer Präparation von Monomeren (Chl*IP) zwischen 264 K und 328 K, so ändert sich, bis auf eine unwesentliche Verbreiterung der Hauptabsorptionsbande mit steigender Temperatur, im Spektrum nichts (s. Abb. V.1(2)).

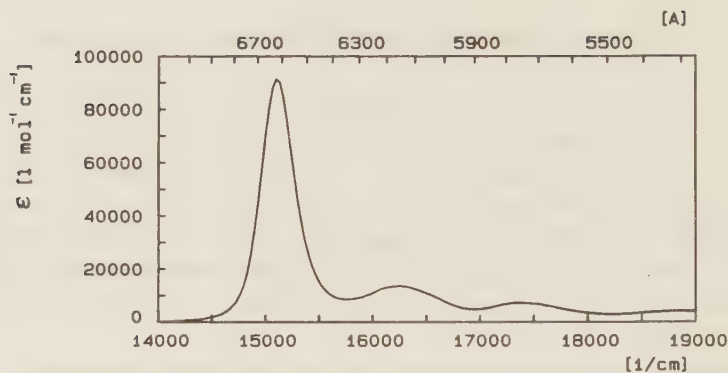


Abb. V.1(1) Absorptionsspektrum von umgerechnet
1 mol l^{-1} Chlorophyll a- Monomer (Chl*IP) in
Dodecan bei 297 K

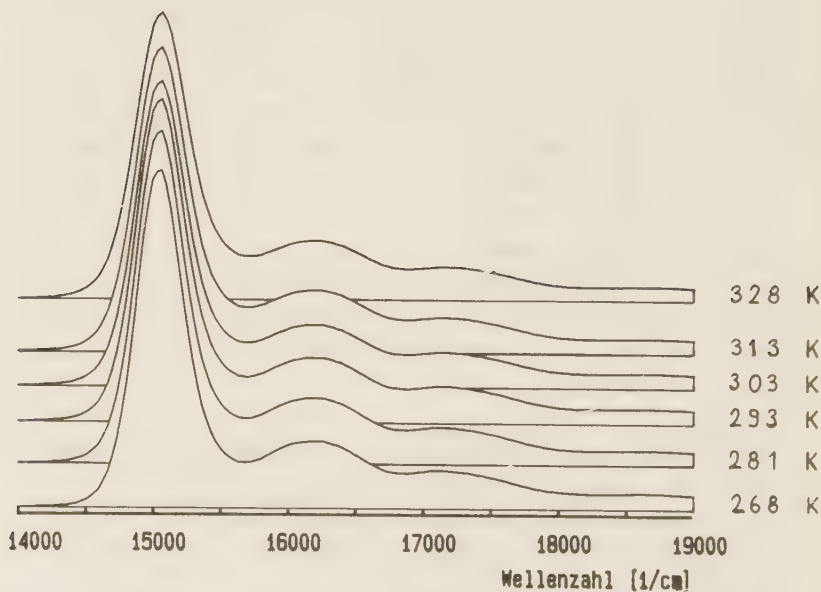


Abb. V.1(2) Temperaturabhängigkeit des Absorptionsspektrums
von $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a in Dodecan +
0.02 mol l^{-1} IP

1.2 Dimere

Bei trockener, d.h. möglichst nukleophilfreier Präparation bilden sich in der Lösung im wesentlichen Dimere (s. Kap. III.2.3) und das Spektrum von Chl a in Dodecan ändert sich drastisch. Abb. V.1(3) zeigt das entsprechende Spektrum umgerechnet auf eine Dimerkonzentration von 1 mol l^{-1} . Die verwendete Meßprobe hatte eine Nominalkonzentration von $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a.

Wie deutlich zu sehen ist, weist der $Q_y(0,0)$ Übergang eine Doppelstruktur mit einem Maximum bei 666 nm (molarer Exkoeffizient von $104\,000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und einer fast gleich hohen Schulter bei 678 nm auf.

Auch die Spektren der Dimere $(\text{Chl})_2$ ändern sich unter Einfluß einer Temperaturvariation wenig (s. Abb. V.1.(4)). Lediglich die Absenkung zwischen Maximum und Schulter ist bei tieferen Temperaturen deutlicher ausgeprägt.

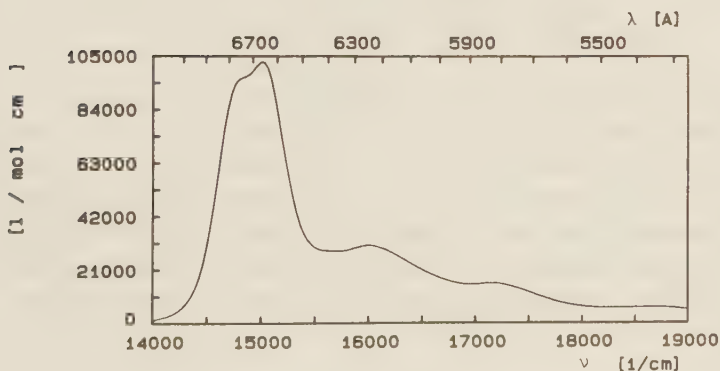


Abb. V.1(3) Absorptionsspektrum des Dimers $(\text{Chl})_2$ bei 300 K; umgerechnet auf 1 mol l^{-1} $(\text{Chl})_2$ in Dodecan

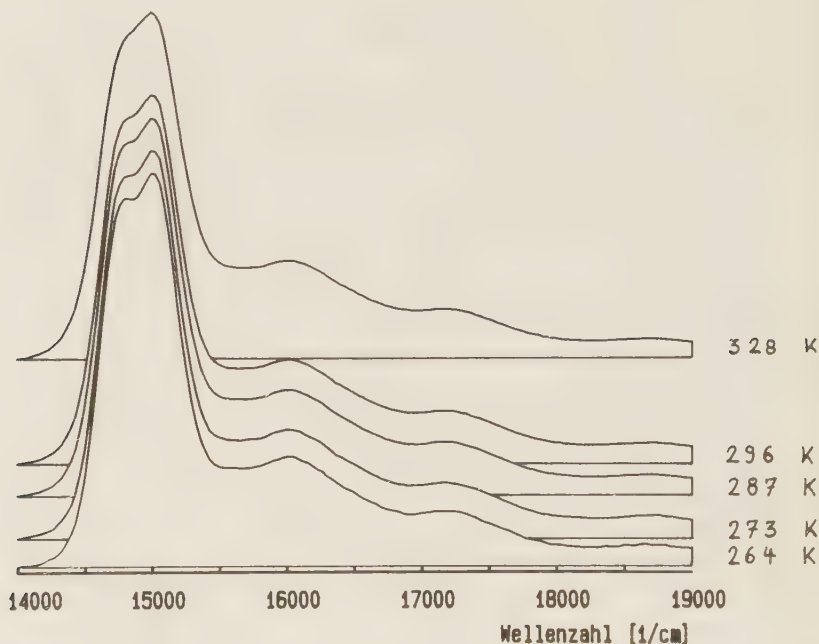


Abb. V.1(4) Temperaturabhängigkeit der Absorption von Chl a in trockenem Dodecan; Konzentration $1.2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a

Bei der Verwendung von H_2O als Nukleophil ist nur ein Teil der Chl a-Moleküle zu Dimeren aggregiert. Die Größe dieses Anteils hängt sowohl von der Nukleophilkonzentration, als auch von der Temperatur der Lösung ab. Abb. V.1(5) zeigt die Temperaturabhängigkeit einer Lösung von $1.3 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a in Dodecan mit $4.1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$. Mit zunehmender Temperatur nimmt die aus dem Dimerspektrum in Abb. V.1(3) bekannte Schulter bei 678 nm zu.

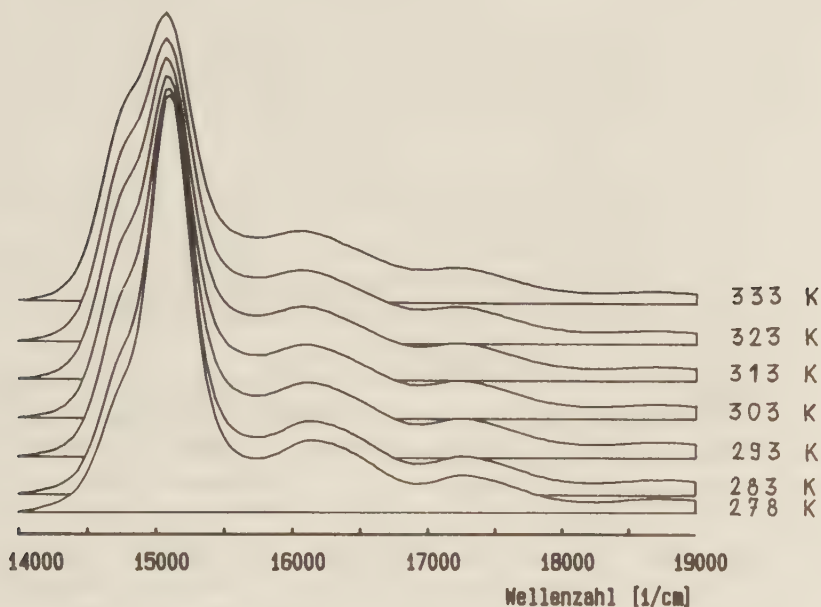


Abb. V.1(5) Temperaturabhängigkeit des Absorptionsspektrums von $1.3 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a in Dodecan + $4.1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$; Ansteigen der Schulter bei 678 nm ($14\,750 \text{ cm}^{-1}$) mit steigender Temperatur

Steigert man die Wasserkonzentration weiter, so beobachtet man bei tieferen Temperaturen im Bereich von 700 nm ($14\,280 \text{ cm}^{-1}$) eine weitere Schulter (s. Abb. V.1(6)), die jedoch bei höheren Temperaturen vollständig verschwindet.

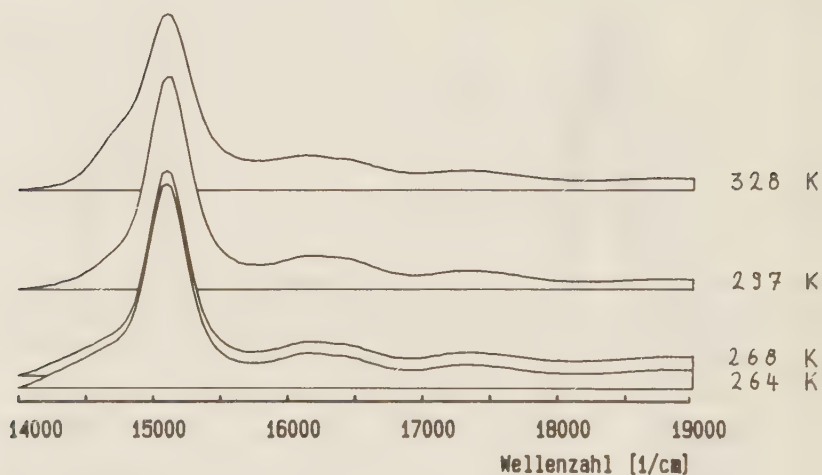


Abb. V.1(6) Temperaturabhängigkeit des Absorptionsspektrums von $5.4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a in Dodecan + $6.1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$; Ansteigen der Schulter bei 678 nm (14750 cm^{-1}) u. Verschwinden der Schulter bei 700 nm (14280 cm^{-1}) mit steigender Temperatur

2. Fluoreszenzmessungen von Chlorophyll a in Dodecan

2.1 Monomere

Die Fluoreszenz der Chlorophyll a-Monomere in Dodecan und anderen untersuchten unpolaren Lösungsmitteln (Cyclohexan C_6H_{12} , Tetrachlorkohlenstoff CCl_4), in denen ausreichende Konzentrationen von polaren Lösungsmitteln (2-Propanol, H_2O) vorhanden sind, zeigt vergleichbare Eigenschaften wie die Fluoreszenz in reinen, polaren Lösungsmitteln / 28// 50/. Das nicht zeitaufgelöste Fluoreszenzspektrum (im Folgenden cw-Spektrum genannt) von (Chl*L) in Dodecan (s. Abb. V.2(1)) zeigt das Maximum des $Q_y(0,0)$ Überganges bei 15.100 cm^{-1} (668 nm) mit dem charakteristischen geringen Stokesshift von 135 cm^{-1} gegenüber der Energie des Absorptionsmaximums.

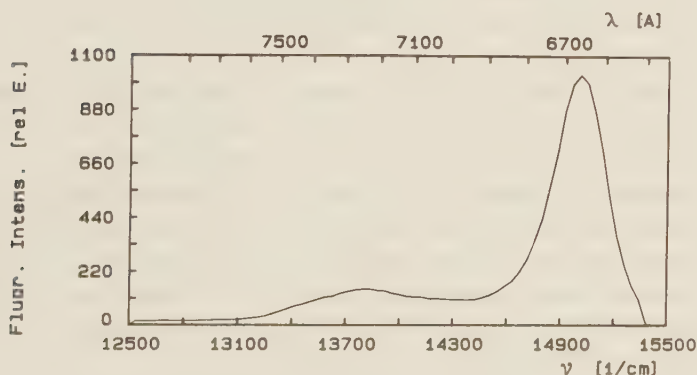


Abb. V.2(1) Fluoreszenzspektrum von $10^{-5}\text{ mol l}^{-1}$ Chl a in Dodecan + 0.02 mol l^{-1} IP; cw-Anregung bei 660 nm; Polarisation der Emission: 54.7°

Neben der $Q_y(0,0)$ -Fluoreszenzbande bei 668 nm ist bei 725 nm (13.795 cm^{-1}) die $Q_y(0,1)$ -Emissionsbande deutlich ausgeprägt. Die Halbwertsbreite der Hauptbande beträgt 360 cm^{-1} . Zu verschiedenen Emissionswellenlängen gemessene Anregungsspektren - hier nicht gezeigt - reproduzieren das Absorptionsspektrum des Chl a-Monomeren. Das heißt: das in Abb. V.2(1) gezeigte Spektrum entspricht der Fluoreszenz der Monomere (Chl*IP).

Die Quantenausbeute (QE) der Monomerfluoreszenz wurde relativ zur Fluoreszenz von Kresylviolet (LAMBDA PHYSIK) bestimmt. Sie beträgt 0.3 ± 0.03 und liegt im Bereich der in der Literatur angegebenen Quantenausbeuten von Chl a-Monomeren in Aceton (0.3)/ 28% , Pyridin (0.35)/ 28% und Ethanol (0.22) / 7% .

Kresylviolet in alkoholischer Lösung ist wegen seiner Absorption im Bereich der, mit DCM erreichbaren, Pumpwellenlängen um 600 nm und seiner Emission mit dem Maximum bei ca. 638 nm als QE-Standard sehr gut geeignet. Die QE von Kresylviolet ist 0.54 ± 0.05 / 43% .

Die Fluoreszenzabklingfunktion (S. Abb. V.2(2)) von Chl a-Monomeren in Dodecan nach einem Anregungspuls von 10 ps Breite ist nahezu monoexponentiell mit einer Zeitkonstanten von $5.94 \pm 0.03 \text{ ns}$. Ein Monoexponentialfit zeigt für Zeiten $< 1000 \text{ ps}$ nach dem Maximum der Anregungsintensität hervorragende, gleichmäßig um Null verteilte Residuen. Ca. 1 % der Fluoreszenzintensität relaxiert jedoch schneller. Es wurde versucht die gesamte Fluoreszenz als Linearkombination von 2 exponentiellen Zerfällen zu beschreiben. Ein solcher Ansatz bietet bei qualitativ gleich guten Fits keine eindeutigen Lösungen und kann ohne weitere Informationen über die Probe nur als Anhalt für die tatsächlichen Relaxationsvorgänge gewertet werden.

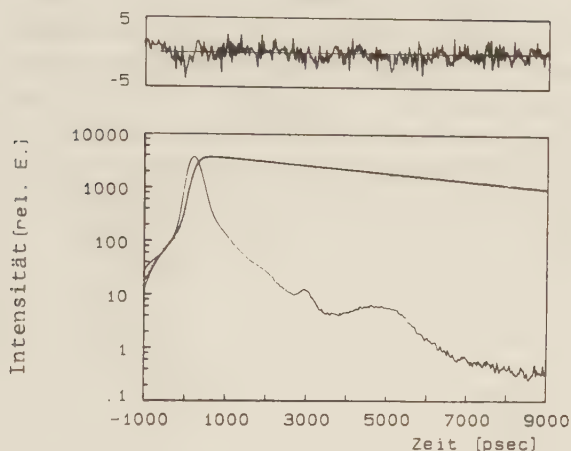


Abb. V.2(2) Fluoreszenzabklingfunktion von 10^{-5} mol l^{-1} Chl a in Dodecan + 0.02 mol l^{-1} IP; Anregung bei 634 nm;

a) Emission bei 660 nm; Polarisierung der Emission: 54.7° ; Temp.: 300 K

b) Impulsantwort des Meßsystems

c) gewichtete Residuen eines 2 Exponential-fits mit den Parametern:

τ (ps)	p
5940	234
450	37

Entsprechend dem nahezu exakt monoexponentiellen Verlauf der Fluoreszenzabklingfunktion zeigen die zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren (s. hierzu Kap. IV.2.2.2.2) von Chl a-Monomeren in Dodecan (s. Abb. V.2(3)) kaum Änderungen im spektralen Verhalten gegenüber dem cw-angeregten Fluoreszenzspektrum. Bei genauer Betrachtung ist das im ersten Meßfenster F_1 (-510 ps bis 255 ps) aufgenommene Spektrum um ca. 150 cm^{-1} zu höheren Energien hin verschoben. Dies korrespondiert zu den nichtmonoexponentiellen Intensitätsanteilen in der Fluoreszenzabklingfunktion (Abb. V.2(2)).

Temperaturvariationen der Probe im Bereich zwischen 264 K (Festpunkt von Dodecan) und 333 K zeigen im Bereich der Meßgenauigkeit keine Änderung der Fluoreszenzspektren.

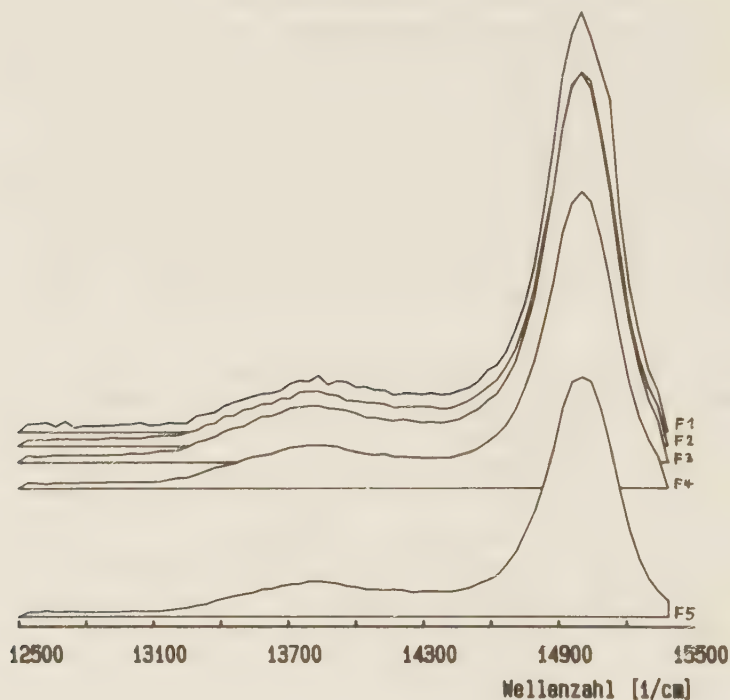


Abb. V.2(3) Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a in Dodecan + 0.02 mol l^{-1} IP; Anregung bei 634 nm; Polarisation der Emission: 54.7° ; Temp.: 300 K
Parameter ist die Lage der Meßfenster auf der Zeitachse (von oben nach unten zunehmende Zeit)
(Beschreibung der Zeitfenster F₁-F₅ in Kap. 3.2.2.2)

2.2 Dimere

Die Fluoreszenz der Chl a-Dimere, wie sie in unpolaren Lösungsmitteln gebildet werden, unterscheidet sich deutlich von der Fluoreszenz der Monomere. Die Unterschiede zwischen den untersuchten unpolaren Lösungsmitteln Dodecan, Cyclohexan und CCl_4 sind jedoch nur sehr gering und nicht prinzipieller Natur. Aus diesem Grund werden hier nur Daten und Spektren von Chl a in Dodecan vorgestellt.

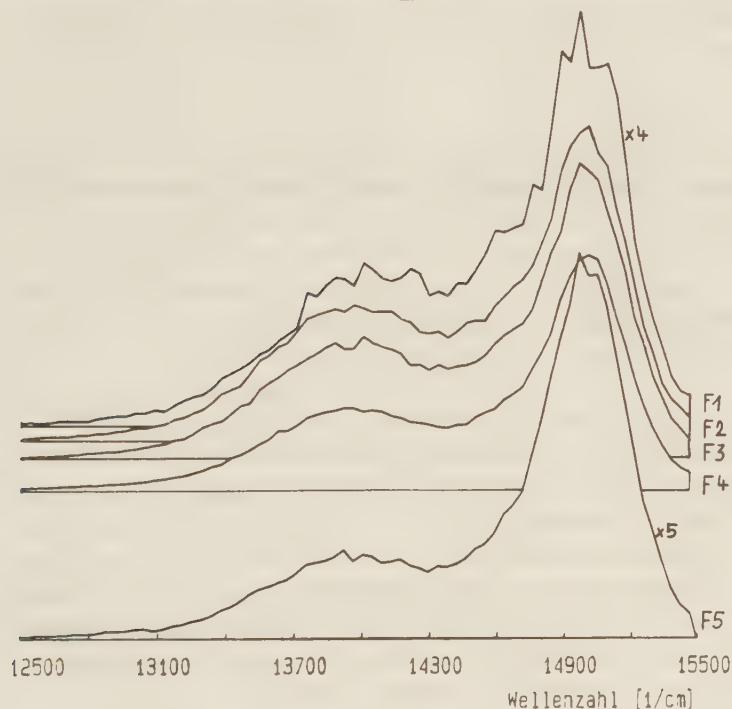


Abb. V.2(4) Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a in H_2O -gesättigtem Dodecan; Anregung bei 634 nm; Temp.: 268 K; Polarisation der Emission: 54.7°
Parameter ist die Lage der Meßfenster auf der Zeitachse
(Beschreibung der Zeitfenster F₁-F₅ in Kap. 3.2.2.2)

Abb. V.2(4) zeigt die bei 268 K gemessene, zeitaufgelöste Fluoreszenz der Probe aus Abb. V.1(4), die in H_2O -gesättigtem Dodecan $5.4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a enthält. Gegenüber der zeitaufgelösten Fluoreszenz der Monomere (s. Abb. V.2(3)) erkennt man bei kurzen Zeiten eine Schulter bei 685 nm ($14\,600 \text{ cm}^{-1}$), die auf die Bildung von $(\text{Chl})_2$ -Dimeren hinweist. Im kurzen und mittleren Zeitbereich ist deutlich eine zusätzliche, breite Emissionsbande bei 715 nm ($14\,000 \text{ cm}^{-1}$) zu sehen. Diese wird durch die Fluoreszenz der $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_2$ -Dimere erklärt.

Die C_2 -symmetrischen $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_2$ -Dimere, die sich bei tiefen Temperaturen in Anwesenheit genügender Konzentrationen von Wasser bilden (s. Abb. V.1(4)), zeigen - selektiv bei 700 nm angeregt - ein cw-Fluoreszenzspektrum (s. Abb. V.2(5)), dessen Maximum bei 715 nm (14.000 cm^{-1}) liegt und eine Halbwertsbreite von 930 cm^{-1} hat. Der Stokesshift ist bei dieser Spezies 300 cm^{-1} .

Die Quantenausbeute dieser C_2 -symmetrischen Chl a-Dimere in Dodecan wurde bei 268 K mit 0.4 ± 0.1 gemessen. In der Literatur wird für C_2 -symmetrische Pyrochlorophyll a-Dimere eine QE von 0.32 angegeben / 53/ .

Die Lebensdauer der Emission bei 715 nm wird optimal durch einen monoexponentiellen Zerfall mit einer Zeitkonstanten von 3,9 ns (hier nicht gezeigt) beschrieben. In der Literatur wird für $(\text{Chl} \cdot \text{EtOH})_2$ in Methycyclohexan bei Zimmertemperatur als Lebensdauer 4.2 ns angegeben / 79/.

Ebenso wie die zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren der Monomere, zeigen auch die Fluoreszenzspektren der selektiv bei 700 nm angeregten C_2 -symmetrischen Dimere in den verschiedenen Zeitfenstern nahezu keine Strukturänderungen (s. Abb. V.2(6)). Lediglich im F_5 -Zeitfenster (8.925 ns bis 11.985 ns nach der Anregung) zeigt sich eine Schulter, die durch die längerlebige Fluoreszenz der Monomere, die bei 700 nm noch

mit etwa 1% der absorbierten Intensität angeregt werden, verursacht ist.

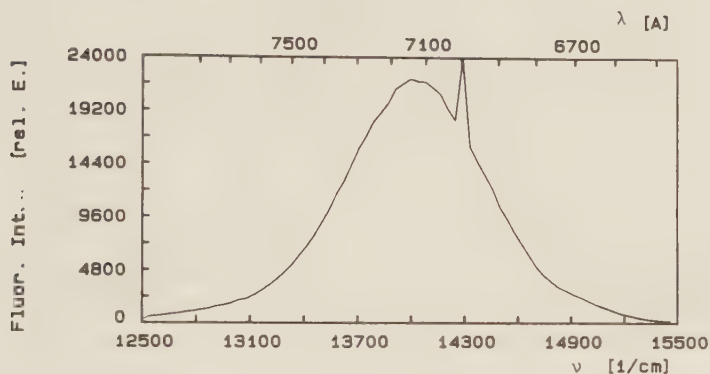


Abb. V.2(5) Fluoreszenzspektrum von $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_2$ (C_2 -sym.) in H_2O -gesättigtem Dodecan; cw-Anregung bei 700 nm; Temp.: 268 K; Polarisation der Emission: 54.7°

Die Intensität der Fluoreszenz der C_2 -symmetrischen Dimere reduziert sich entsprechend ihrer abnehmenden Konzentration, wenn die Temperatur der Probe erhöht wird. Die Fluoreszenzspektren zeigen dann zunehmend die Struktur der Emissionsspektren der Monomere (s. Abb. V.2(3)).

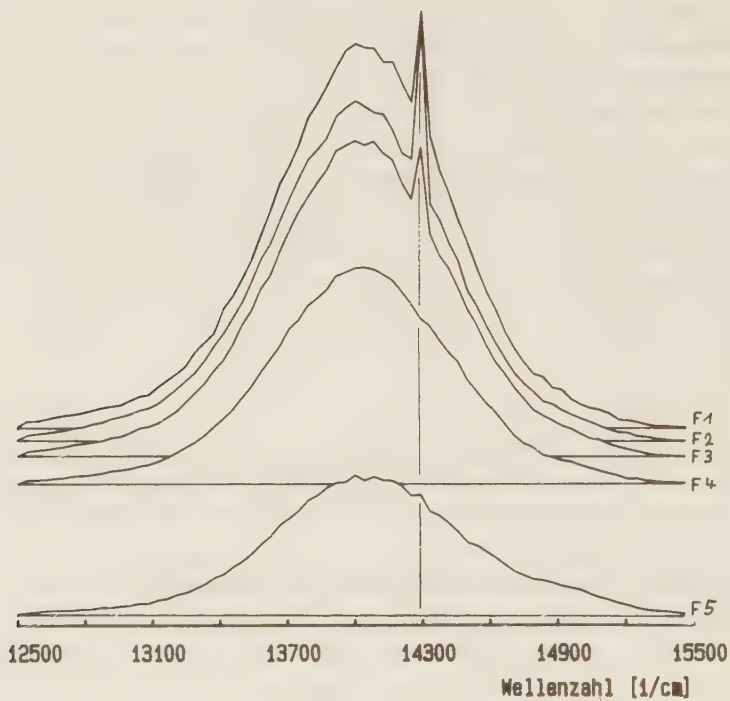


Abb. V.2(6) Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})_2$ (C_2 -sym.) in H_2O -gesättigtem Dodecan; Anregung bei 700 nm; Temp.: 268 K; Polarisation der Emission: 54.7°

Parameter ist die Lage der Meßfenster auf der Zeitachse (von oben nach unten zunehmende Zeit)

(Beschreibung der Zeitfenster F_1 - F_5 in Kap. 3.2.2.2)

Die Fluoreszenz der selbstaggregierten Chl a-Dimere (Chl)₂ bedarf einer etwas eingehenderen Untersuchung als die Fluoreszenzspektren von Monomeren und C₂-symmetrischen Dimeren. Zunächst fällt auf, daß die Anregungsspektren (s. Abb. V.2(7)) - an verschiedenen Emissionswellenlängen aufgenommen - nicht das Absorptionsspektrum der Probe reproduzieren. Je nach Emissionswellenlänge liefern die Absorptionsbanden mit den Maxima bei 680 nm ($14\,750\text{ cm}^{-1}$) und 666 nm ($15\,000\text{ cm}^{-1}$) unterschiedliche Beiträge zur Fluoreszenzintensität.

Die Dimere (Chl)₂ zeigen in ihrem Emissionsverhalten also nicht die Eigenschaften einer homogenen Probe, sondern den unterschiedlichen Emissionswellenlängen sind unterschiedliche Bereiche im Absorptionsspektrum zuzuordnen. Demzufolge zeigen die cw-Fluoreszenzspektren bei verschiedener Anregungswellenlänge unterschiedliche Strukturen (s. Abb. V.2(8)).

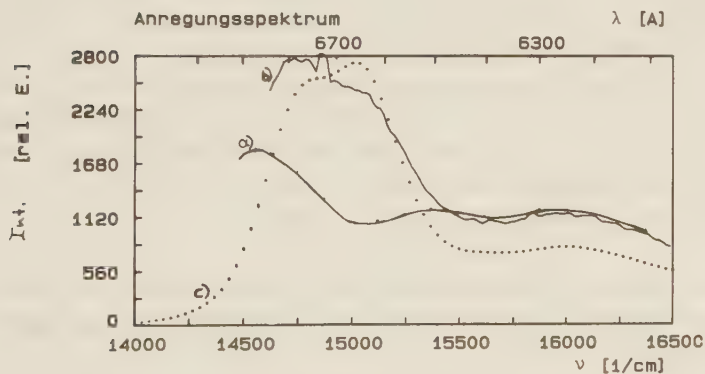


Abb. V.2(7) Anregungsspektren von $6 \cdot 10^{-6}\text{ mol l}^{-1}$ (Chl)₂ in Dodecan;
 a) Emission bei 690 nm;
 b) Emission bei 725 nm;
 c) Absorptionsspektrum (rel. Einheiten)

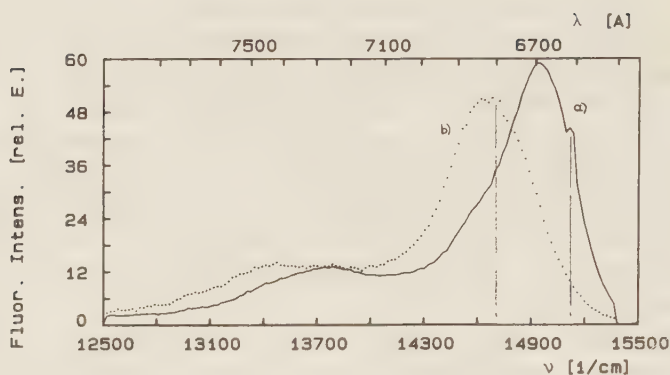


Abb. V.2(8) Fluoreszenzspektrum $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} (\text{Chl})_2$ in Dodecan; Temp.: 300 K; Polarisation der Emission: 54.7° ; cw-Anregung bei
 a) 660 nm ,
 b) 680 nm;

Cw-Anregung bei Zimmertemperatur im Bereich des höherenergetischen Maximums der Absorptionsdoppelstruktur bei 660 nm zeigt eine Fluoreszenzverteilung (Spektrum a) in Abb. V.2(8)), die bis auf eine Schulter bei 14.600 cm^{-1} vergleichbar ist mit dem Spektrum des Chl a-Monomer (Abb. V.2(1)). Auch die Stokesverschiebung der Maxima von 90 cm^{-1} ist vergleichbar klein. Die Halbwertsbreite der Hauptemissionsbande beträgt 525 cm^{-1} .

Die bei der Anregung bei 660 nm gemessene Quantenausbeute ist 0.008 ± 0.002 . Hierfür gibt es in der Literatur keinen Meßwert.

Die Abklingfunktion der Fluoreszenz der $(\text{Chl})_2$ -Proben (Anregung bei 660 nm; Emission bei 668 nm) zeigt nahezu monoexponentiellen Zerfall. Die Lebensdauer des angeregten Zustandes beträgt $5.92 \text{ ns} \pm 0.03$ bei allen untersuchten Temperaturen (264 K bis 328 K). Die Amplitude dieser Emission nimmt mit steigender Temperatur jedoch leicht ab.

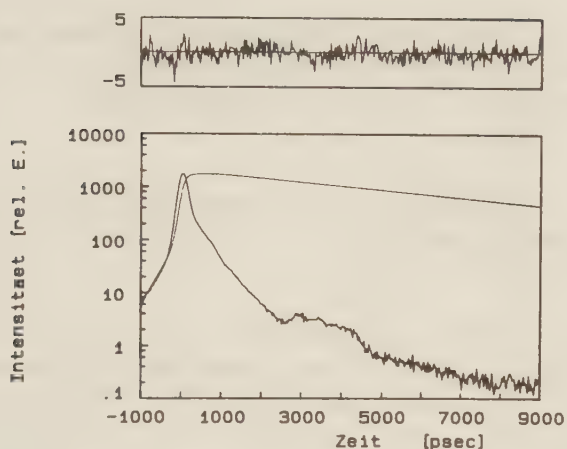


Abb. V.2(9) Fluoreszenzabklingfunktion von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} (\text{Chl})_2$ in Dodecan; Anregung bei 660 nm; Polarisation der Emission: 54.7° ; Temp.: 264 K

a) Emission bei 668 nm
 b) Impulsantwort des Meßsystems
 c) gewichtete Residuen eines 3 Exponentialfits mit den Parametern:

$\tau(\text{ps})$	p
5910	145
1090	14
106	40

Aus einem Monoexponentialfit dieser Fluoreszenz ist zu erkennen, daß ein Teil (ca. 2.5% bei 264 K) der emittierten Energie mit einer schnelleren Zeitkonstanten als 5.92 ns relaxiert. Abb. V.2(9) zeigt einen Fit für eine Summe von 3 Exponentialfunktionen, wobei die schnelleren Relaxationmechanismen als zwei weitere exponentielle Zerfälle angenommen wurden. Hinreichend gute Residuen nach dem χ^2 -Kriterium (hier 0.97) erhält man mit den zusätzlichen Lebensdauern 1.09 ns und 0.1 ns.

Die Amplituden und Zeiten aus Lebensdaueranalysen bei verschiedenen Temperaturen, Anregungswellenlängen und Emissionswellenlängen sind in Tab. VI.2(2) wiedergegeben.

Die zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren zeigen für unterschiedliche Zeitfenster zum Teil recht erhebliche strukturelle Unterschiede.

Regt man die $(\text{Chl})_2$ -Lösung bei 660 nm an, beobachtet man im F_1 -Zeitfenster ein Fluoreszenzspektrum, das neben dem Emissionsmaximum bei 668 nm (14.970 cm^{-1}) eine in der Intensität nur wenig schwächere Schulter bei 685 nm (14.600 cm^{-1}) (s. Abb. V.2(10)). Mit nach der Anregung fortschreitender Zeit (F_2 bis F_5) wird die Ausprägung dieser Schulter immer geringer. Zu der Emissionsbande bei 668 nm gehört im Abstand von 1170 cm^{-1} eine schwächere Bande bei 725 nm (13.800 cm^{-1}).

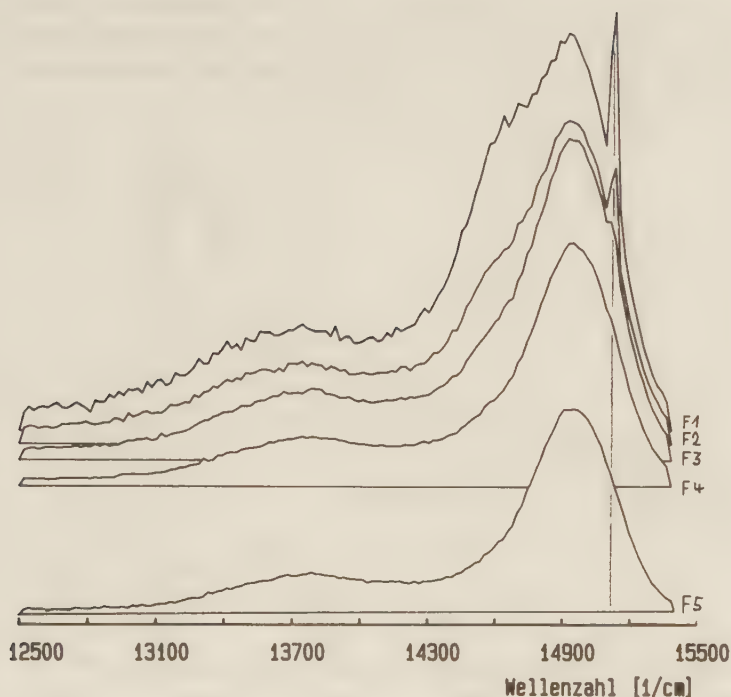


Abb. V.2(10) Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} (\text{Chl})_2$ in Dodecan;
 Anregung bei 660 nm; Polarisierung der Emission: 54.7° ; Temp.: 296 K
 Parameter ist die Lage der Meßfenster auf der Zeitachse (von oben nach unten zunehmende Zeit)
 (Beschreibung der Zeitfenster F₁-F₅ in Kap. 3.2.2.2)

Kühlt man die "trocken" präparierte Probe auf 264 K ab, tritt in allen Zeitfenstern (s. Abb.V.2(11)) die Schulterstruktur bei 14.600 cm^{-1} (685 nm) deutlicher heraus.

Die Halbwertsbreite der Hauptbande bei 14.970 cm^{-1} (668 nm) bleibt nahezu konstant 465 cm^{-1} .

Die Intensität der Fluoreszenz steigt mit abnehmender Temperatur an, und zwar stärker als durch die Dichtezunahme des Lösungsmittels (Erhöhung der Konzentration) zu erwarten wäre.

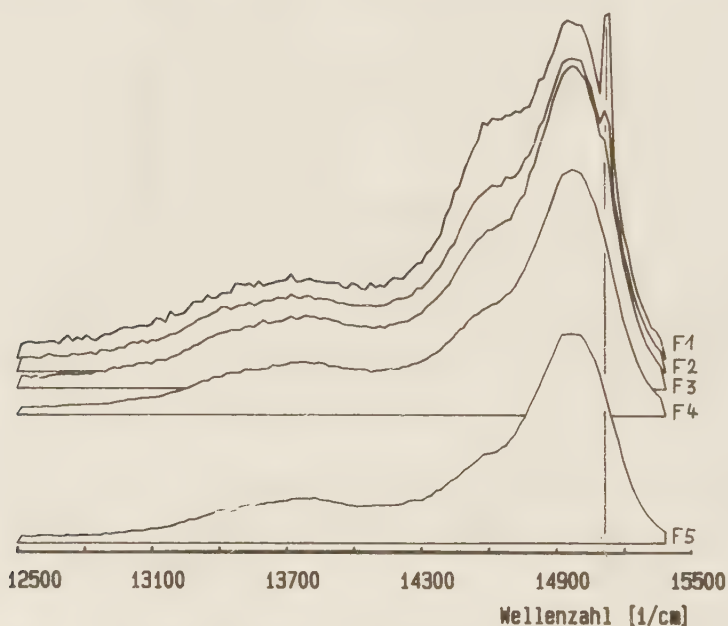


Abb. V.2(11) Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ $(\text{Chl})_2$ in Dodecan; Anregung bei 660 nm; Polarisation der Emission: 54.7° ; Temp.: 264 K
Parameter ist die Lage der Meßfenster auf der Zeitachse (von oben nach unten zunehmende Zeit)
(Beschreibung der Zeitfenster F₁-F₅ in Kap. 3.2.2.2)

Bei Erhöhung der Proben temperatur auf 328 K (s. V.2(12)) zeigen sich kaum Änderungen gegenüber der Emission bei 300 K.

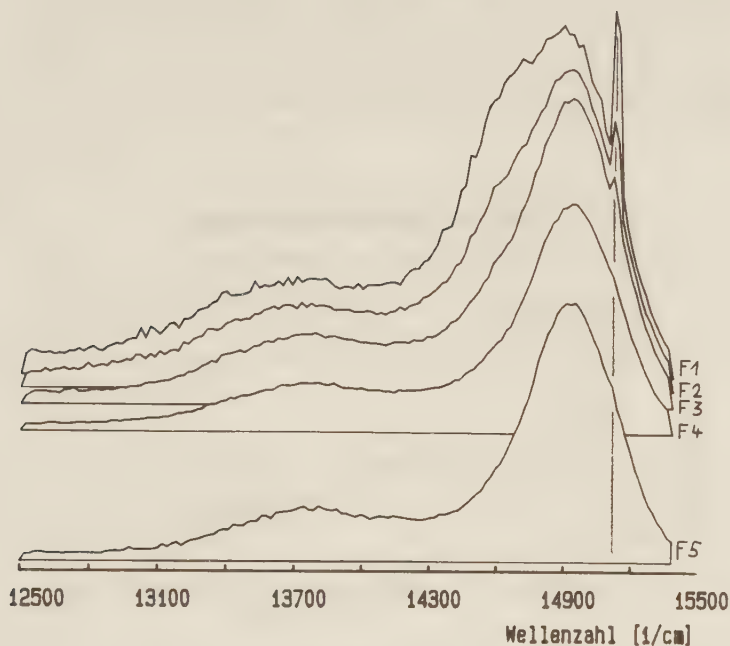


Abb. V.2(12) Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ $(\text{Chl})_2$ in Dodecan;
 Anregung bei 660 nm; Polarisation der Emission: 54.7° ; Temp.: 328 K
 Parameter ist die Lage der Meßfenster auf der Zeitachse (von oben nach unten zunehmende Zeit)
 (Beschreibung der Zeitfenster F_1 - F_5 in Kap. 3.2.2.2)

Regt man im Bereich des niederenergetischen Maximums (Schulter) des Absorptionsspektrums des $(\text{Chl})_2$ bei 680 nm an, so erhält man das Spektrum b) in Abb. V.2(8). Das Maximum der Emission ist nach 14.600 cm^{-1} verschoben, was einem Stokes-

shift von 150 cm^{-1} gegenüber 680 nm entspricht. Die Halbwertsbreite der Hauptemissionsbande beträgt 600 cm^{-1} .

Die QE ist bei dieser Anregung (680 nm) mit 0.005 ± 0.001 noch deutlich geringer als unter Anregung bei 660 nm .

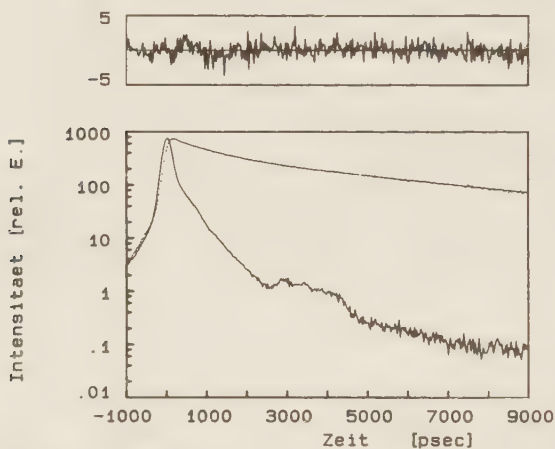


Abb. V.2(13) Fluoreszenzabklingfunktion von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} (\text{Chl})_2$ in Dodecan; Anregung bei 680 nm ; Polarisation der Emission: 54.7° ; Temp.: 295 K
 a) Emission bei 685 nm
 b) Impulsantwort des Meßsystems
 c) gewichtete Residuen eines 3 Exponentialfits mit den Parametern:

$\tau(\text{ps})$	p

5660	25
900	36
130	74

Die Fluoreszenzabklingfunktion des $(\text{Chl})_2$ in Dodecan, angeregt bei 680 nm , ist deutlich nicht monoexponentiell (s. Abb. V.2(13)). Es kann in einem Fit mit einem 3 Exponentialfunk-

tionenansatz auch hier eine "langlebige" Komponente von $5.66 \text{ ns} \pm 0.25 \text{ ns}$ beobachtet werden, mit der ca. 75% der insgesamt emittierten Energie relaxiert. Ca. 17% der Intensität wird mit einer Lebensdauer von 1.06 ns und ca. 8% wird mit einer Zeitkonstanten von 0.13 ns emittiert. Die Residuen für diesen Fit ($\chi^2 = 1$) sind hervorragend statistisch um 0 verteilt

Regt man bei Zimmertemperatur eine Probe von $(\text{Chl})_2$ in Dodecan bei 680 nm an, so zeigt das zeitaufgelöste Fluoreszenzspektrum im Meßfenster F_1 ein Emissionsmaximum bei 685 nm (14.600 cm^{-1}) (s. Abb. V.2(14)). Die Asymmetrie der Bande deutet auf eine weitere Emissionsbande im Bereich von 672 nm (14.880 cm^{-1}) hin.

Die Emission im Bereich von 672 nm (14.880 cm^{-1}) wird mit zunehmender Zeit dominant (s. F_2 bis F_5 in Abb. V.2(14)). Mit der Emission bei 14.600 cm^{-1} (685 nm) ist stets im Abstand von ca. 1200 cm^{-1} eine schwächere Bande im Bereich von 13.400 cm^{-1} (746 nm) zu beobachten.

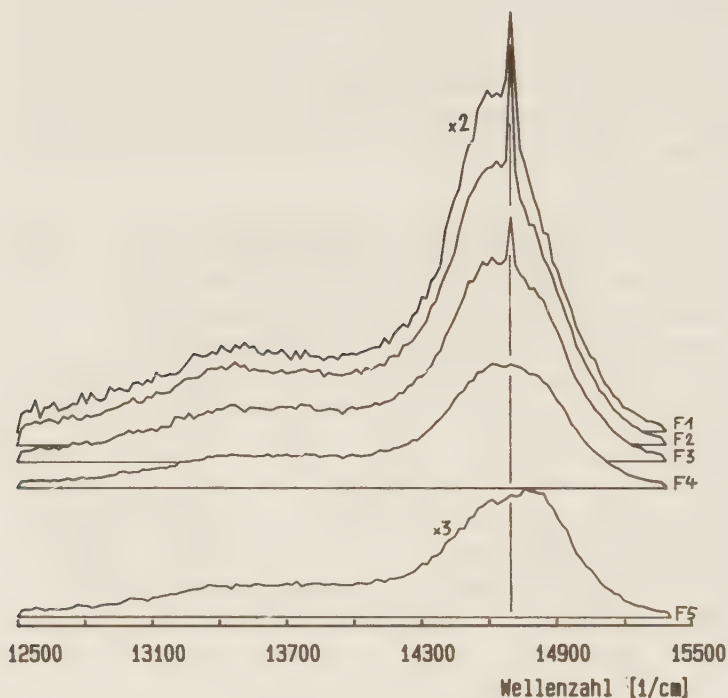


Abb. V.2(14) Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} (\text{Chl})_2$ in Dodecan;
 Anregung bei 680 nm; Polarisation der Emission: 54.7° ; Temp.: 296 K
 Parameter ist die Lage der Meßfenster auf der Zeitachse (von oben nach unten zunehmende Zeit)
 (Beschreibung der Zeitfenster F₁-F₅ in Kap. 3.2.2.2)

Variation der Probentemperatur zeigt in den zeitaufgelösten Emissionsspektren bei Anregung bei 680 nm noch drastischere Änderungen im spektralen Verlauf, als bei 668 nm Anregung.

Bei tiefen Temperaturen sind die zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren F_1 - F_5 (s. Abb. V.2(15)) nahezu identisch. Ein dem F_1 -Spektrums bei Zimmertemperatur ähnliches Fluoreszenzspektrum mit dem Emissionsmaximum bei 14.600 cm^{-1} (685 nm) ist während der gesamten Relaxationszeit konstant vorhanden. Es ist jedoch zu beachten, daß die Halbwertsbreite mit 435 cm^{-1} bei 268 K gegenüber 510 cm^{-1} bei Zimmertemperatur etwas kleiner ist.

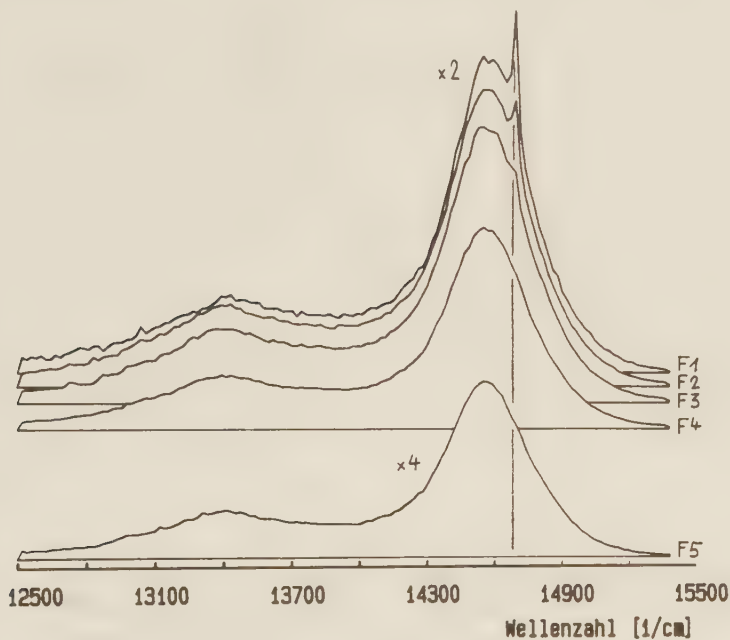


Abb. V.2(15) Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von $6 \cdot 10^{-6}\text{ mol l}^{-1}$ $(\text{Chl})_2$ in Dodecan;
Anregung bei 680 nm ; Polarisation der Emission: 54.7° ; Temp.: 264 K
Parameter ist die Lage der Meßfenster auf der Zeitachse (von oben nach unten zunehmende Zeit)
(Beschreibung der Zeitfenster F_1 - F_5 in Kap. 3.2.2.2)

Die bereits bei Zimmertemperatur zu beobachtende Verschiebung des Maximums der Emission von 14.600 cm^{-1} (685 nm) nach 14.880 cm^{-1} (672 nm) mit zunehmender Zeit nach der Anregung (s. Abb. V.2(14)) ist in den zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren von $(\text{Chl})_2$ in Dodecan bei 328 K noch deutlicher ausgeprägt (s. Abb. V.2(16)).

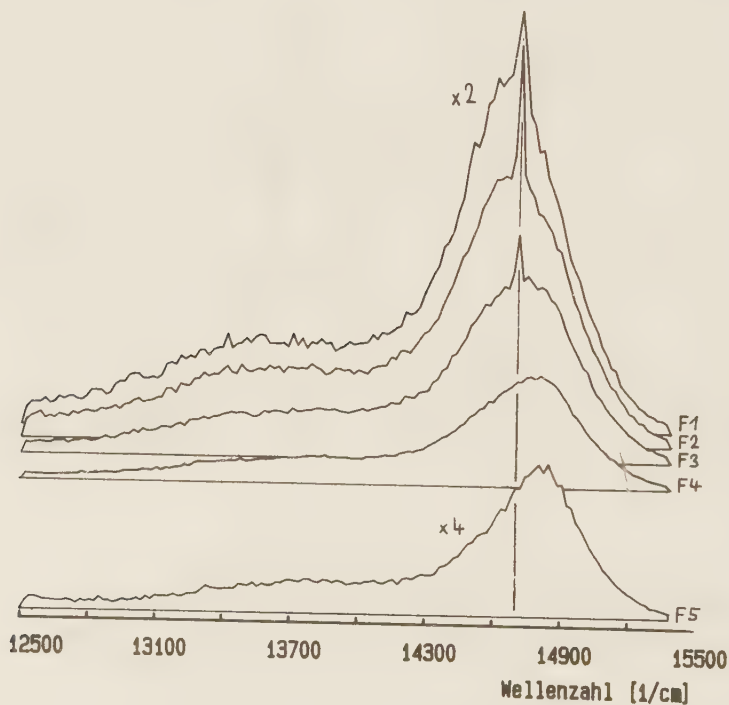


Abb. V.2(16) Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von $6 \cdot 10^{-6}\text{ mol l}^{-1}$ $(\text{Chl})_2$ in Dodecan; Anregung bei 680 nm; Polarisation der Emission: 54.7° ; Temp.: 328 K
Parameter ist die Lage der Meßfenster auf der Zeitachse (von oben nach unten zunehmende Zeit)
(Beschreibung der Zeitfenster F_1 - F_5 in Kap. 3.2.2.2)

3. Polarisationsanisotropiemessungen der Fluoreszenz von Chlorophyll a-Lösungen in Dodecan

Durch die lineare Polarisation des anregenden Laserlichtes zeigt die Fluoreszenz von in Lösung isotrop orientierten Molekülen eine Polarisationsanisotropie (s. Kap. IV.3.2.2.3). Die photoselektiv angeregten Moleküle verlieren durch Rotation während der Lebensdauer des angeregten Zustandes jedoch ihre Vorzugsrichtung und emittieren mit fortschreitender Zeit zunehmend isotrop polarisiert. Neben der Reduktion der Polarisationsanisotropie durch Rotation können auch Energie-transfer und ähnliche Mechanismen zu einer Beschleunigung der Depolarisation der Fluoreszenz führen. Der maximal mögliche Wert für die Anisotropie r_0 ist in Flüssigkeiten 0.4, wenn absorbierendes Übergangsdipolmoment und emittierendes Dipolmoment übereinstimmen oder parallel orientiert sind. Rotationsdepolarisation reduziert diesen Wert mit zunehmender Zeit, wobei die gemessene Zeitfunktion von geometrischen Eigenschaften des Moleküls und u. a. von der Viskosität des Lösungsmittels abhängt und somit eine Funktion der Temperatur ist.

Ein Maß für die spektrale Verteilung der Anfangsanisotropie r_0 kann aus den zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren im Meßfenster F_1 (s. Kap. 3.2.2.2) gewonnen werden.

Die Anfangsanisotropie sowie die Zeitfunktion der Depolarisation kann an diskreten Wellenlängen aus den - für zwei orthogonale Polarisationsrichtungen gemessenen - Fluoreszenzabklingkurven im Rahmen der Zeitauflösung des Meßsystems exakt bestimmt werden.

3.1 Monomere

Die spektrale Verteilung der Fluoreszenzanisotropie der Monomere (Chl*IP) in Dodecan bei 268 K zeigt in der Zeitauflösung nahezu konstanten Verlauf bei allen Emissionswellenlängen (s. Abb. V.3(1)).

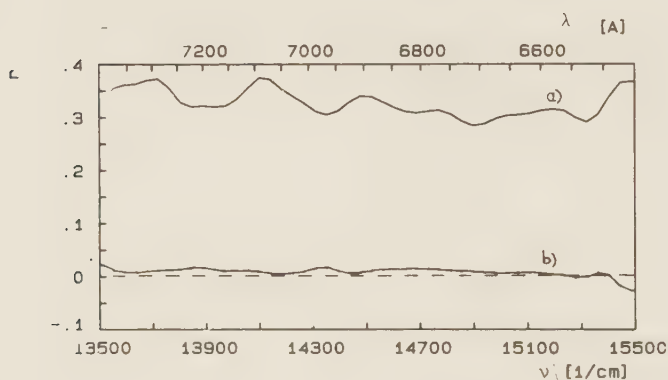


Abb. V.3(1) Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie von $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a in Dodecan + 0.02 mol l^{-1} IP; Anregung bei 660 nm; Temp.: 268 K
 a) F_1 -Zeitfenster
 b) F_5 -Zeitfenster

Die Zeitfunktion der Fluoreszenzdepolarisation wurde am Maximum der Monomeremission bei 14.970 cm^{-1} (668 nm) gemessen (s. Abb. V.3(2)). Sie ist nahezu monoexponentiell (Abfall auf r_0/e nach 0.95 ns bei 268 K) und zeigt eine Anfangsanisotropie von $r_0 = 0.35$.

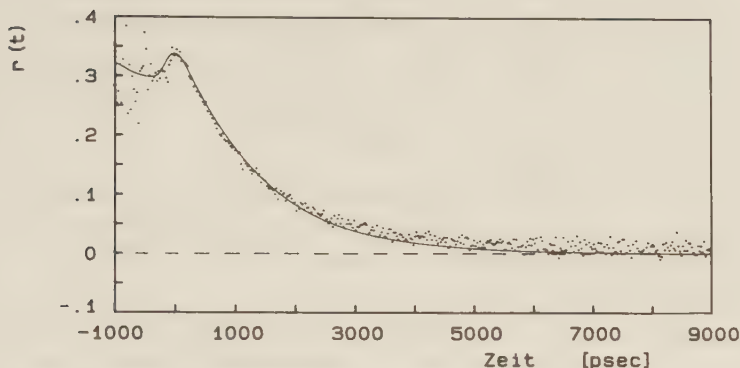


Abb. V.3(2) Zeitfunktion der Fluoreszenzdepolarisation von $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ Chl a in Dodecan + 0.02 mol l^{-1} IP; Anregung bei 660 nm; Emission bei 668 nm; Temp.: 268 K
Die durchgezogene Linie zeigt den besten Fit mit monoexponentiellem Zerfall:
 $\phi = 0.95 \text{ ns}$; $r_0 = 0.35$

3.2 Dimere

Die Dimere $(\text{Chl})_2$ in Dodecan und anderen unpolaren Lösungsmitteln zeigen in der Anfangsanisotropie der Fluoreszenz deutlich keinen konstanten spektralen Verlauf.

Wird eine Lösung von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ $(\text{Chl})_2$ in Dodecan bei 660 nm angeregt, fällt im F_1 -Zeitfenster des zeitaufgelösten Anisotropiespektrums (s. Abb. V.3(3)) bei 14.600 cm^{-1} (685 nm) eine deutlich geringere Anfangsanisotropie als bei 14.970 cm^{-1} (668 nm) auf. Mit zunehmender Zeit gleicht sich dieser relative Unterschied unter gleichzeitiger Abnahme der Anisotropie immer mehr aus (siehe F_5 -Zeitfenster).

Die Zeitfunktion der bei 14.970 cm^{-1} (668 nm) gemessenen Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz einer Lösung von $6 \cdot 10^{-6}\text{ mol l}^{-1}$ $(\text{Chl})_2$ in Dodecan (s. Abb. V.3(4)) ist fast monoexponentiell (Abfall auf r_0/e nach 1.6 ns bei 268 K) und zeigt eine Anfangsanisotropie von $r_0 = 0.28$.

Wird die Zeitfunktion der Fluoreszenzanisotropie dieser Probe dagegen bei 14.600 cm^{-1} (685 nm) gemessen (s. Abb. V.3(5)), so ist die Fluoreszenz zu allen Zeiten nahezu isotrop. Im Bereich um $t=0$ zeigt sich zunächst eine deutlich geringere Anisotropie an, die zu größeren Anisotropiewerten hin anklängt. Ein Monoexponentialfit liefert keine befriedigenden Ergebnisse.

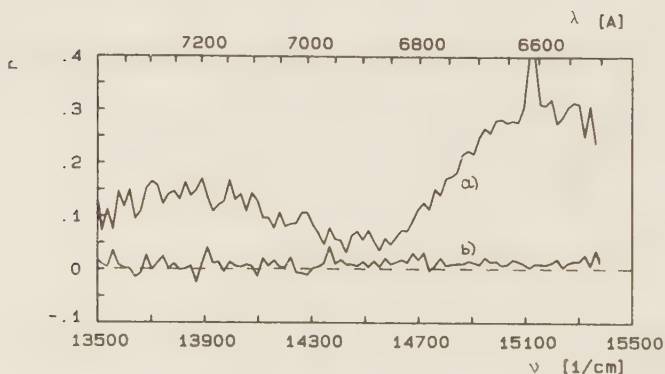


Abb. V.3(3) Zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropie von $6 \cdot 10^{-6}\text{ mol l}^{-1}$ $(\text{Chl})_2$ in Dodecan
Anregung bei 660 nm ; Temp.: 268 K
a) F_1 -Zeitfenster
b) F_5 -Zeitfenster

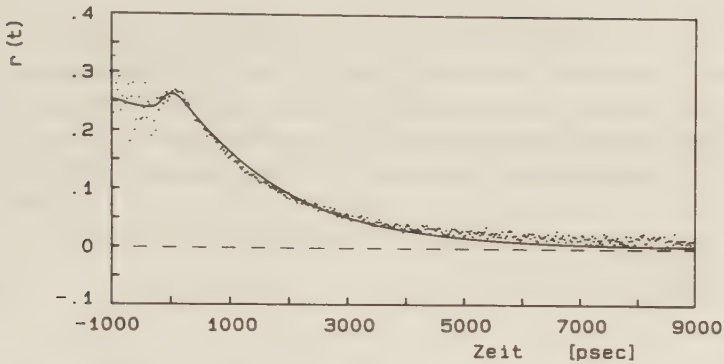


Abb. V.3(4) Zeitfunktion der Fluoreszenzdepolarisation von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} (\text{Chl})_2$ in Dodecan
 Anregung bei 660 nm; Emission bei 668 nm;
 Temp.: 268 K
 Die durchgezogene Linie zeigt den besten Fit mit
 monoexponentiellem Zerfall:
 $\phi = 1.6 \text{ ns}$; $r_0 = 0.28$

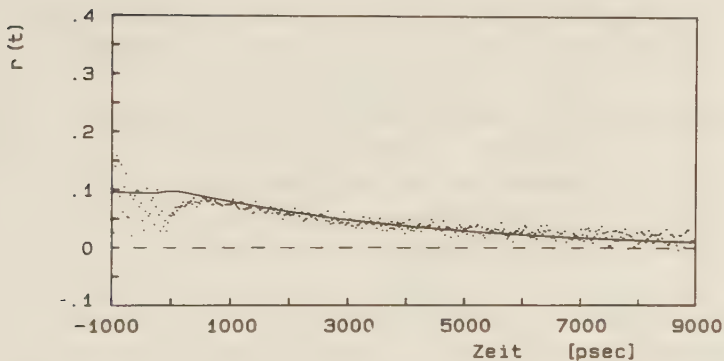


Abb. V.3(5) Zeitfunktion der Fluoreszenzdepolarisation von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} (\text{Chl})_2$ in Dodecan
 Anregung bei 660 nm; Emission bei 685 nm;
 Temp.: 268 K
 Die durchgezogene Linie zeigt den Versuch
 eines monoexponentiellen Fits:
 $\phi = 3.8 \text{ ns}$; $r_0 = 0.1$

Wird eine Lösung von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ $(\text{Chl})_2$ in Dodecan bei 680 nm angeregt, zeigt sich im F_1 -Zeitfenster des zeitaufgelösten Anisotropiespektrums (s. Abb. V.3(6)) bei 15.150 cm^{-1} (660 nm) eine deutlich geringere Anfangsanisotropie als bei 14.600 cm^{-1} (685 nm). Mit zunehmender Zeit gleicht sich dieser Unterschied auch hier bei gleichzeitiger Abnahme der Anisotropie immer mehr aus.

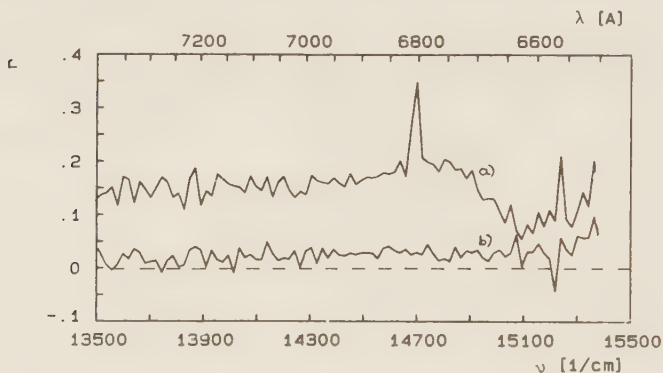


Abb. V.3(6) Zeitaufgelöste Fluoreszenz-anisotropie von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ $(\text{Chl})_2$ in Dodecan
Anregung bei 680 nm; Temp.: 268 K
a) F_1 -Zeitfenster
b) F_5 -Zeitfenster

Die Zeitfunktion der bei 14.880 cm^{-1} (672 nm) gemessenen Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz der Probe aus Abb. V.3(6) (s. Abb. V.3(7)) ist nur unzureichend mit einem monoexponentiellen Zerfallsgesetz anzupassen. Sie zeigt eine Anfangsanisotropie von $r_0 = 0.16$.

Wird die Zeitfunktion der Fluoreszenzpolarisationsanisotropie bei 14.600 cm^{-1} (685 nm) gemessen (s. Abb. V.3(8)), so ist die Anfangsanisotropie 0.18. Ein Fit mit einer einzigen Exponentialfunktion liefert unbefriedigende Ergebnisse; er reicht

nicht zur Beschreibung der Depolarisationsfunktion aus. Biexponentielle Zerfälle als Grundlage für einen Fit benötigen, um signifikante Aussagen zu gestatten, sehr gute Signal-Rausch-Verhältnisse in den Messungen und sind deshalb nur bei relativ hohen Fluoreszenzintensitäten sinnvoll (s. Kap. VI).

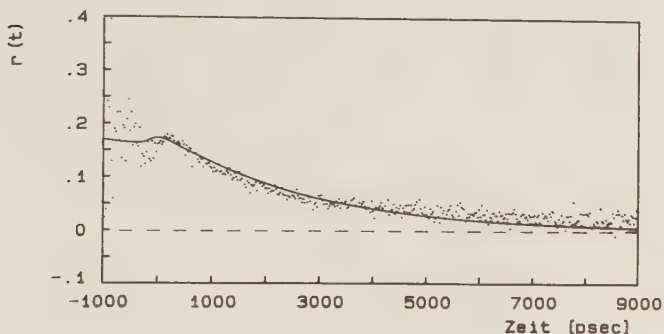


Abb. V.3(7) Zeitfunktion der Fluoreszenzdepolarisation von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} (\text{Chl})_2$ in Dodecan
 Anregung bei 680 nm; Emission bei 672 nm;
 Temp.: 268 K
 Die durchgezogene Linie zeigt den Versuch eines Fits mit einem monoexponentiellem Zerfall:
 $\phi = 2.5 \text{ ns}$; $r_0 = 0.1$

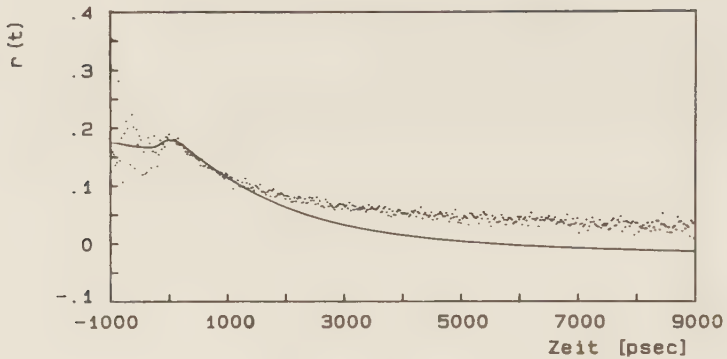


Abb. V.3(8) Zeitfunktion der Fluoreszenzdepolarisation von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} (\text{Chl})_2$ in Dodecan
Anregung bei 680 nm; Emission bei 685 nm;
Temp.: 268 K
Die durchgezogene Linie zeigt den Versuch
eines Fits mit einem monoexponentiellem
Zerfall:
 $\phi = 1.7 \text{ ns}; r_0 = 0.19$

VI. Diskussion

1. Absorption

- 1.1 Qualitative Beschreibung des Chlorophyll a-in vitro-Systems
- 1.2 Einfluß von Nukleophilen
- 1.3 Einfluß der Temperatur
- 1.4 Quantitative Analyse und Interpretation der Absorption des (Chl)₂-Systems

2. Fluoreszenz

- 2.1 Fluoreszenz der Chlorophyll a-Monomere
 - 2.1.1 Spektren
 - 2.1.2 Zerfallsfunktion des S₁-Zustandes
 - 2.1.3 Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz
- 2.2 Fluoreszenz der Chlorophyll a-Dimere
 - 2.2.1 Spektren
 - 2.2.2 Zerfallsfunktionen des S₁-Zustandes
 - 2.2.3 Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz

3. Interpretation des Chlorophyll a-in vitro-Systems

VI. Diskussion

1. Absorption

1.1 Qualitative Beschreibung des Chl a-in vitro-Systems

Eine der wahrscheinlichen physikalischen Zustandsformen des Chl a, wenn es als PSII der höheren Pflanzen den eigentlichen Prozess der Ladungstrennung bewirkt, ist der Dimer $(\text{Chl})_2$ (s. z.B. / 34/). In vitro bildet sich dieser Dimer durch Selbstaggregation auf Grund des amphoteren Charakters des Chl a-Moleküls in unpolaren Lösungsmitteln sehr effektiv, wenn polare Komponenten nicht oder nur in geringen Konzentrationen vorhanden sind.

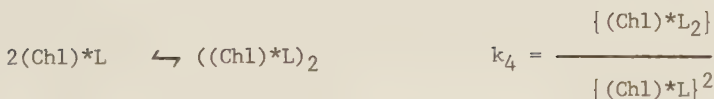
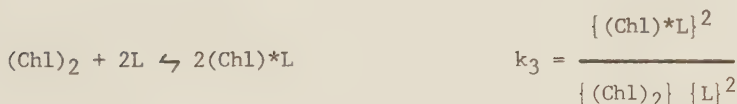
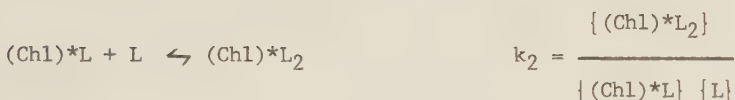
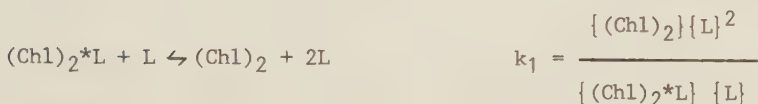
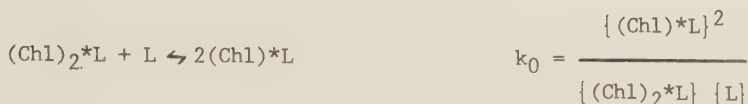
Während der säulenchromatographischen Herstellung des Chl a sowie der Präparation der Proben in den Spektroskopieküvetten läßt sich der Eintrag von nukleophilen Spuren (H_2O , Alkohole etc.) nicht vollständig ausschließen. Diese polaren Gruppen verhindern proportional zu ihrer Konzentration die vollständige Selbstaggregation von Chl a zu Dimeren.

In einer Lösung von Chl a in unpolaren Lösungsmitteln mit nukleophilen Lösungsmittelanteilen stellt sich ein Reaktionsgleichgewicht zwischen hetero-ligierten Chl a-Monomeren und selbstaggregierten Chl a-Dimeren und freien Nukleophilen ein. Weiterhin können sich verschiedene Kombinationen aus Chl a und Nukleophilen L ausbilden. Deren Konzentrationen hängt von den Konzentrationen $\{C_i\}$ von Chl a und L sowie der Temperatur der Lösung ab.

In dem untersuchten System stellen sich demnach aus:

- $(\text{Chl})_2$: selbstaggregierten Dimeren
- $(\text{Chl})_2^*L$: monoligierten Dimeren
- $(\text{Chl}^*L)_2$: biligierten Dimeren ("special pairs")
- $(\text{Chl})^*L$: monoligierten Monomeren
- $(\text{Chl})^*L_2$: biligierten Monomeren

folgende Reaktionsgleichgewichte / 26// 37/ mit den entsprechenden Reaktionskonstanten k_i ein:



Der Ligationsgrad der Monomere und der Dimere kann durch die vier funktionalen Gruppen des Chl a-Moleküles (2 freie Koordinationen des Mg, die C₁₀-Ketogruppe und die C₉-Ketokarboxylgruppe) vielfach verschieden sein. Bei geringen Konzentrationen an Nukleophilen jedoch zeigt sich, daß die Liganden (das können Nukleophile oder ein anderes Chl a-Molekül sein) entweder an einer Mg-Koordination oder der C₉-Ketogruppe / 37/ angreifen.

Erst starke Nukleophile wie Pyridin bewirken in genügend

hoher Konzentration eine Hexakoordination des Mg-Zentralatoms.

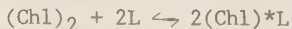
Es ist daher unabdingbar, die jeweiligen Konzentrationen von Chl a-Monomeren und -Dimeren in den untersuchten Proben zu bestimmen und deren spektroskopische Eigenschaften getrennt zu untersuchen.

Neben der "trockenen" Form $(\text{Chl})_2$ und dem zweifach ligierten Monomer $(\text{Chl})^*\text{L}_2$ sind in den in vitro Systemen prinzipiell alle Zwischenstufen möglich, jedoch nicht gleich wahrscheinlich. Ist die Konzentration der Nukleophile gering, überwiegen die monoligierten und nukleophilfreien Spezies.

1.2 Einfluß von Nukleophilen

Zur Bestimmung der Reaktionskonstanten wurden Titrationsexperimente mit - in Dodecan in beliebigem Verhältnis mischbarem - Isopropanol durchgeführt. Es wurde hierbei eine Gaußbandenanalyse / 26/ des Absorptionsspektrums im Bereich der niederenergetischen Übergänge $Q_y(0,0)$ durchgeführt: dem Chl^*L wurde eine Gaußkurve zugeordnet; die Gaußkurven von Chl_2 (Donor; s. Kap. III.2.3.1) und Chl_2^*L (monoligierter Donor) sowie die Gaußkurven von Chl_2 (Akzeptor; s. Kap. III.2.3.1) und Chl_2^*L (monoligierter Akzeptor) wurden als energetisch entartet angenommen, um konsistente Fits zu erreichen.

So können die selbstaggregierten, reinen Dimere mit den monoligierten Dimeren zusammengefasst werden, und es wurde die Annahme gemacht, daß sich das Gleichgewicht im wesentlichen auf die Reaktion



mit der Reaktionskonstanten k_3

$$k_3 = \frac{\{(\text{Chl})^*\text{L}\}^2}{\{(\text{Chl})_2\} \{L\}^2}$$

beschränkt. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten an in vitro-Systemen dieses Typs / 12/.

Bei sehr geringen Spuren an Nukleophilen und damit hohen Dimerkonzentrationen, wurden die Konzentrationen der Einzelkomponenten nicht durch Gaußkurvenanalyse bestimmt, sondern durch das in Kap. IV.2.2 beschriebene iterative Komponentenanalyseverfahren, das auf der Kenntnis der jeweiligen Absorptionsspektren der quantitativ zu bestimmenden Spezies beruht.

Die Bestimmung der Reaktionskonstanten k_3 ist mit einfachen spektroskopischen Mitteln nur größenordnungsmäßig möglich. Da nämlich die Nukleophilkonzentration entscheidend in die Bestimmungsgleichungen eingeht, limitiert deren Kenntnis die Genauigkeit der Aussage über die Reaktionskonstanten. Die Konzentration von H_2O ist jedoch bei trockener Präparation im Bereich der Chl $\underline{a}$ -Nominalkonzentration und darunter, d. h. $<10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. In diesem Konzentrationsbereich gibt es im Augenblick keine verwendbare analytische Methode zur Wassergehaltsbestimmung. Deshalb wurden nach optimaler Reinigung und Trocknung der Probe, der Lösungsmittel und der verwendeten Geräte von nukleophilen Einträgen angenommen, daß der vorhandene Wassergehalt neben dem Gehalt an Chl $\underline{a}$ praktisch vernachlässigt werden kann.

Durch die Unsicherheit in der Bestimmung des geringen Nukleophilgehaltes in wasserhaltigen Proben läßt sich zunächst nur eine Aussage über die Größe von $k_3 * \{L\}^2$ machen. Unter der Annahme, daß in Lösungen, die große Anteile an Monomeren enthalten, der Wassergehalt durch die Löslichkeitsgrenze in Dodecan von $\{L\} = 6.1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ / 61/ bei Zimmertem-

peratur gegeben ist, läßt sich auch k_3 berechnen. Setzt man die aus der Komponentenanalyse der Absorptionsspektren gewonnenen Konzentrationen für die Dimere $\{(\text{Chl})_2\}$ und die Monomere $\{\text{Chl} \cdot \text{L}\}$ in die Reaktionsgleichung für k_3 ein, erhält man mit Wasser als Nukleophil für verschiedene Meßserien die Werte 2 und $10 \text{ l mol}^{-1} / 89/$.

Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung, wie die für Isopropanol in Dodecan / 26/.

Die Streubreite dieser Werte liegt darin begründet, daß die herangezogenen Meßserien Chl a-Nominalkonzentrationen in fast gleicher Größenordnung wie die Nukleophilkonzentration enthielten. Der unbekannte Eintrag an Nukleophilen, die in der festen Phase an das Chl a gebunden waren, ist in der Reaktionsgleichung jedoch nicht berücksichtigt (s. Kap.VI.1.4).

Zusammenfassend ist zu sagen, daß aus den Absorptionsspektren die Zusammensetzung der Proben bis zu einer absoluten Genauigkeit von ca. 1% errechenbar ist. Es war somit möglich, die Probenzusammensetzung aus Dimeren $(\text{Chl})_2$ und Monomeren $(\text{Chl} \cdot \text{L})$ über die Nukleophilkonzentration gezielt einzustellen, um physikalische Merkmale des $(\text{Chl})_2$ gegenüber dem Monomer herauszupräparieren.

1.3 Einfluß der Temperatur

In polaren Lösungsmitteln (2-Propanol, Ether etc.) liegt Chl a ausschließlich als Monomer vor. Variiert man die Temperatur einer solchen Lösung, bleibt die Bandenform des Absorptionsspektrums erhalten (s. Abb. V.1(2)).

In unpolaren Lösungsmitteln ist die Untersuchung von $(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})$ Monomeren durch das temperaturabhängige Aggregationsverhalten des Chlorophyll a selbst in H_2O gesättigtem Dodecan zu komplex, um aussagekräftige Ergebnisse über das Verhalten des Chl a-Monomeren in diesem Lösungsmittel zu erzielen.

Zur Untersuchung der Chl a-Monomere wurden aus diesem Grunde

Lösungen von Chl a in Dodecan mit dazutitriertem 2-Propanol verwendet.

Über weite Konzentrationsbereiche von 2-Propanol (IP) hinweg unterscheiden sich die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von (Chl*H₂O) und (Chl*IP) in Dodecan nicht / 26/. Erst ab Konzentrationsverhältnissen von 2-Propanol zu Chl a über 30.000 werden spektrale Veränderungen sichtbar, die auf die Bildung anderer Aggregationsformen wie (Chl*IP)₂ zurückzuführen sind (evtl. (Chl*(IP)₂) / 26/.

Mit der Temperatur ändert sich die Gesamtabsorption. Die Größe dieser Änderung ist in Abb. VI.1.3(1) dargestellt. Im Rahmen der Meßgenauigkeit ist die Absorptionsänderung hauptsächlich auf die Konzentrationsänderung durch die relative Volumenänderung des Lösungsmittels mit der Temperatur zurückzuführen, die bei Dodecan im Bereich der Zimmertemperatur 0.001 K⁻¹ beträgt / 90/.

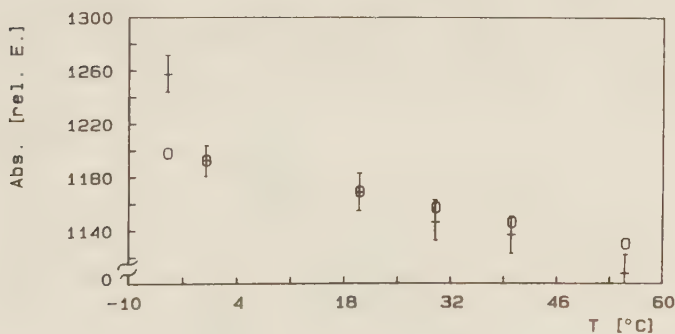


Abb. VI.1.3(1) Änderung der Gesamtabsorption von Chl a in 2-Propanol

(+) gemessene Gesamtabsorption

(o) konzentrationskorrigierter integrierter Absorptionskoeffizient bezogen auf die Messung bei 0 °C

Die zusätzliche Abschwächung der Gesamtaborption mit steigender Temperatur ist wahrscheinlich auf die Verringerung der Konzentration von C_2 -symmetrischen Aggregaten mit 40% größerer Oszillatorenstärke / 91/ als der Monomer zurückzuführen, die vornehmlich bei tieferen Temperaturen gebildet werden / 79/.

Variiert man die Temperatur einer Lösung von Chl a in H_2O -gesättigtem Dodecan, so ändert sich die Aggregationsform der Chl a-Moleküle sehr viel deutlicher.

Sind die polaren Spuren im Lösungsmittel bifunktionale Liganden, die sowohl an dem Mg-Zentralatom als auch an der C_9 -Ketogruppe angreifen können, wird bei genügend hohen Chlorophyllkonzentrationen (d.h. $>10^{-5}$ mol l^{-1}) und Ligandenkonzentrationen beim Abkühlen der Proben die Bildung einer weiteren Hetero-Aggregationsform beobachtet. Diese Aggregate wurden in Lösungen von Chl a in Methylcyclohexan bzw. Toluol mit Beimengungen von Ethanol / 79/ bzw. 2-Propanol / 13/ (s. Abb. VI.1.3(2)) beobachtet.

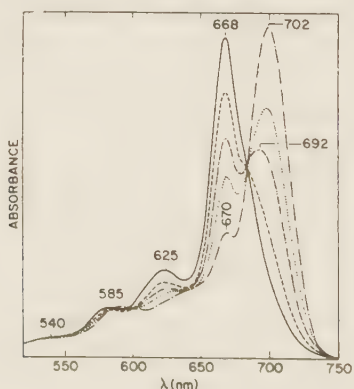


Abb. VI.1.3(2) Temperaturabhängigkeit des Absorptionsspektrums von $(Chl \cdot L)_2$ mit C_2 -Symmetrie in Toluol mit $1.5 \text{ mol (mol(Chla))}^{-1}$ Ethanol:

—, 298 K; ----, 273 K; - · - ·, 247 K;
 , 224 K; - - - , 175 K; entnommen aus / 13/

Auf Grund der spektroskopischen Eigenschaften (Rotverschiebung der $Q_y(0,0)$ Absorption nach 700 nm / 6/; Fluoreszenzmaximum bei 730 nm / 53/; Symmetrie des Grundzustandes 1H Spin-Gitter-Relaxationszeitmessungen / 82/) wird diesem Aggregat eine gefaltete Konformation zugeschrieben, mit parallelen Makroringen in C_2 -Symmetrie. Es gilt allgemein als akzeptiertes Modellsystem ("special pair") für das P700 / 53// 92/ (s. Abb. III.2(2)).

Solche C_2 -symmetrische Aggregate werden auch in wasser-gesättigtem Dodecan gebildet (s. Abb. V.1.(3)), wenn die Temperatur der Probe unterhalb von Zimmertemperatur gebracht wird. Die Ausbildung der Bande bei 700 nm ist - bedingt durch den niedrigen Sättigungswert von H_2O in Dodecan - nur relativ schwach ausgebildet. Bei Erhöhung der Temperatur ändert sich reversibel das Gleichgewicht der verschiedenen Koordinationsformen. Während bei Zimmertemperatur überwiegend Monomere vorhanden sind, bilden sich bei höheren Temperaturen zunehmend Dimere, die sich im Absorptionsspektrum durch eine Doppelstruktur bestehend aus einem Maximum bei 666 nm und einer Schulter bei 678 nm zeigen (s. Abb. V.1(3)). Diese Absorptionsstruktur wird allgemein dem $(Chl)_2$ -Aggregat zugeordnet / 3/.

Ist die Nukleophilkonzentration gering, so wird die Ausbildung der Bande bei 700 nm absorptionspektrometrisch kaum noch nachweisbar, während sich die Schulter bei 678 nm verstärkt. Die Komponentenanalyse der Absorptionsspektren für verschiedene Temperaturen nach Monomeren und Dimeren (s. Abb. VI.1.3(3)) zeigt die Zunahme der Dimerkonzentration mit steigender Temperatur auf Kosten der Monomerkonzentration.

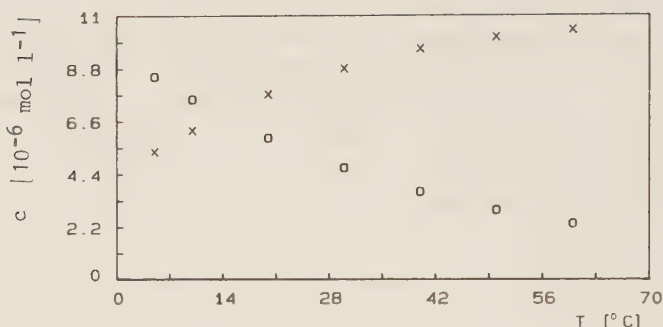


Abb. VI.1.3(3) Konzentrationen von Chl a - Monomeren(o) und -Dimeren(x) in Dodecan als Funktion der Temperatur; die Nominalkonzentration dieser Probe war $1.37 \cdot 10^{-5}$ mol Chl a l⁻¹

Bei trockener Präparation der Proben geht die Temperaturabhängigkeit der Zusammensetzung der Probe, wie sie sich im Absorptionsspektrum in der in Abb. V.1(3) gezeigten Art manifestiert, vollständig verloren.

Neben der Erhöhung der Gesamtaborption bedingt durch die höhere Dichte des Lösungsmittels bei abnehmenden Temperaturen und die deutlicheren Strukturen der Banden durch die temperaturbedingte Verschmälerung sind keine Änderungen in der Zusammensetzung des Spektrums zu beobachten. Dies läßt den Schluß zu, daß die Absorptionsspektren aus Abb. V.1(4) eine Probe von $1.2 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹ Chl a in trockenem Dodecan zeigen, deren Nukleophilgehalt so gering ist, daß die einzig vorhandene Spezies (Chl)₂ ist.

Dies wird unterstützt durch die Meßkurven von Cotton et. al. / 12// 14/, die zeigen, daß eine schrittweise Erhöhung der Chl a-Konzentration bis in den Bereich von ca. 10^{-4} mol l⁻¹ hinein, zu keinen wesentlichen Änderungen im Spektrum führt. Damit können andere Aggregationsformen als (Chl)₂ ausgeschlossen werden.

Dampfphasenosmotrische Messungen von Ballschmiter /79/

bestätigen, daß das erst ab wesentlich höheren Konzentrationen (10^{-2} mol l^{-1}) beobachtbare Anwachsen der Schulter bei 678 nm zu einem Maximum mit der Bildung von höheren Aggregaten $(Chl)_n$ ($n \geq 2$) erklärt werden kann.

Bei trockener Präparation hat man also ein in vitro-System zur Verfügung, das auch bei verschiedenen Temperaturen absorptionspektrometrisch homogen aus $(Chl)_2$ besteht.

1.4 Quantitative Analyse und Interpretation der Absorption des $(\text{Chl})_2$ -Systems

Die Analyse der Absorptionsspektren von $(\text{Chl})_2$ als auch von $\text{Chl } \underline{a}$ -Monomeren, unter der Annahme einer Superposition von mehreren Gaußkurven konnten keine völlig befriedigenden Interpretationsmöglichkeiten für die einzelnen Kurven liefern / 14/.

Shipman et al. versuchten eine Interpretation der Absorptionsspektren von $(\text{Chl})_2$ in CCl_4 / 66/. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß Umgebungseinflüsse die einzelnen Partner eines $(\text{Chl})_2$ bedeutend stärker beeinflussen, als die gegenseitige Wechselwirkung der π -Elektronensysteme. In einer Abschätzung zeigen sie, daß über 85% der Anregungsenergie jeweils in den Bildungspartnern lokalisiert ist. Wegen der geringen Wechselwirkung kann also jedem der beiden $\text{Chl } \underline{a}$ -Moleküle ein individuelles Absorptionsspektrum zugeordnet werden, das jedoch nicht isoliert gemessen werden kann.

Approximierte Absorptionsspektren der einzelnen Bildungspartner eines $(\text{Chl})_2$ Moleküls in Dodecan sind in Abb. VI.1.4(1) gezeigt / 1/. Sie zeigen analoge charakteristische Eigenschaften, wie die oben zitierten Näherungsspektren der Einzelmoleküle des Systems $(\text{Chl})_2$ in CCl_4 / 66/.

Die Rotverschiebung des Maximums des Donorabsorptionsspektrums gegenüber dem des Akzeptorspektrums ist durch die Beteiligung der Ketokarbonylgruppe (C_9) an der Bindung der beiden Moleküle zu erklären / 66/. Das Fehlen des Minimums zwischen der Q_y (0,0)- und der Q_y (0,1)-Bande im Absorptionsspektrum des Donors läßt auf eine starke Rotverschiebung des Q_x (0,0) nach ca. 15.625 cm^{-1} (640 nm) schließen. Eine solche Verschiebung wird in $\text{Chl } \underline{a}$ -Molekülen beobachtet, deren Mg-Zentralatom hexakoordiniert ist (z.B. $\text{Chl } \underline{a}$ in trockenem Pyridin / 64/) und aber auch wiederum dann, wenn die Keto-Gruppe (C_9) in einer Bindung involviert ist (z.B. Pheophytin:Eu(fod)₃ / 66/). Die Tetrakoordination des Mg im

Donor / 12/ dürfte aber bezüglich der Auslenkung des Mg aus der Ebene des Makrorings (s. auch Abb. III.2(1)) diesen Koordinationen entsprechen.

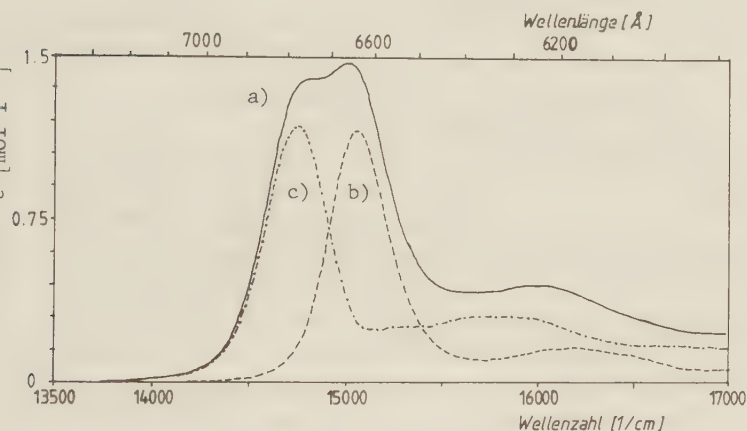


Abb. VI.1.4(1) Absorptionsspektren von 1.55×10^{-5} mol l^{-1} $(Chl)_2$ in Dodecan / 1/
 a) gemessenes Absorptionsspektrum von $(Chl)_2$
 b) Akzeptor (verschobenes Monomerspektrum);
 c) Donor (berechnet durch Subtraktion des Spektrums b) von a)

An Hand der Absorptionsmessungen läßt sich also zeigen, daß $Chl \underline{a}$ in Dodecan in Abwesenheit nukleophiler Spuren selbstaggregierte Dimere $(Chl)_2$ bildet und die Zusammensetzung des Systems mit der Temperatur konstant bleibt.

Die Bildung anderer Aggregationsformen ist jedoch nur in den Grenzen der Meßgenauigkeit, d. h. von ca. 1-2% auszuschließen. Die wahrscheinlichsten weiteren Aggregationsformen sind der $Chl \underline{a}$ -Monomer ($Chl * L$) und der monoligierte Dimer $(Chl) * L$ wobei präparationsbedingt $L = H_2O$ der wahrscheinlichste Ligand ist.

Die Zuordnung der Bandenmaxima im Absorptionsspektrum von Chl a in Dodecan zu den elektronischen Übergängen ist in Tab. VI.1.4(1) zusammengefaßt.

Lösgm.	Absorption		ϵ		Überg.	Zuordnung
	nm	cm ⁻¹		l mol ⁻¹ cm ⁻¹		
Dodecan +						
2-Prop.	662	15.100	M	90.900	Q _y	Chl*L ₁
Dodecan +						
H ₂ O (ges.)	662	15.100	M	90.900	Q _y	Chl*L ₁
"	664	15.060	M	72.300	Q _y	(Chl) ₂ (Akzeptor)
"	678	14.750	S	82.000	Q _y	(Chl) ₂ (Donor)
"	695	14.390	S	126.000 ^{*)}	Q _y	(Chl*L ₁) ₂ (C ₂ -Sym.)
Dodecan						
(trocken)	664	15.060	M	72.300	Q _y	(Chl) ₂ (Akzeptor)
"	678	14.750	M/S	82.000	Q _y	(Chl) ₂ (Donor)

Tab. VI.1.4(1) Maxima der Absorptionsbanden von Chl a in Dodecan
(M = Maximum ; S = Schulter); Maxima der Dimerbil-
dungspartner in trockenem Lsgm. sind approximiert
^{*)} abgeschätzt nach / 91/

In geeignet präparierten Proben kann das Bildungsgleichgewicht zwischen Monomerkonzentration {Chl*L} und Dimerkonzentration {(Chl)₂} mit der Temperatur verschoben werden.

Dabei wird die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgleichgewichtskonstanten k_3 durch die Van't-Hoff-Beziehung gegeben:

$$k_3(T) = k_3 \cdot e^{-E/kT}$$

Die Bildungsenthalpie E zwischen $(\text{Chl})_2 + 2\text{L}$ und $2(\text{Chl}*\text{L})$ läßt sich gewinnen, indem zunächst aus den Konzentrationen $\{\text{Chl}*\text{L}\}$ und $\{(\text{Chl})_2\}$ einer Probe (d.h. $\{\text{L}\} = \text{const.}$) bei verschiedenen Temperaturen T die Reaktionskonstante $k_3(T)$ bestimmt wird. Gemäß

$$E = d(\ln(k_3(T)))/d(1/T) \text{ K}^{-1}$$

kann aus der Steigung der Geraden von $\ln(k_3(T))$ über $1/T$ die Bildungsenthalpie E bestimmt werden.

Für eine solche Bestimmung von E benötigt man Proben, die entsprechend der Reaktionsgleichung ausschließlich $\{(\text{Chl})_2\}$ und $\{\text{Chl}*\text{L}\}$ enthalten. Wie in Kap. VI.1.3 gezeigt, gelingt dies nicht mit verdünnten Proben (d.h. $C_{\text{Chl}} < 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ Chl a}$) in wassergesättigtem Dodecan. Verwendet man allerdings "nahezu" trockenes Dodecan, so zeigt die Absorptionsanalyse bei verschiedenen Temperaturen ausschließlich Monomere und $(\text{Chl})_2$, diese jedoch mit sich stetig ändernden Konzentrationen (s. Abb. V.1.(5)).

Da jedoch die Wasserkonzentration durch einfache Meßmethoden in diesem Konzentrationsbereich nicht mehr zu bestimmen ist, kann zunächst nur $k_3\{\text{L}\}^2$ bestimmt werden.

Bestimmt man nun $k_3\{\text{L}\}^2$ in einer Probe mit bekanntem Wassergehalt (z.B. Sättigungsgehalt) bei der gleichen Temperatur T , kann $k_3(T)$ direkt bestimmt werden. In H_2O -gesättigten Proben nimmt der Gehalt an C_2 -symmetrischen Aggregaten bei höheren Temperaturen auf absorptionsspektrometrisch praktisch nicht mehr nachweisbare Konzentrationen ab.

In Abb. V.1(6) ist der Temperaturgang des Absorptionsspektrums einer Probe gezeigt, die in H_2O -gesättigtem Dodecan präpariert wurde und eine Nominalkonzentration von $5.4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} \text{ Chl a}$ hat. Die Zusammensetzung dieser Probe bei 328 K ist vollständig durch die Dimerkonzentration $\{(\text{Chl})_2\}$ und die Monomerkonzentration $\{\text{Chl}*\text{L}\}$ gegeben

$$\begin{aligned} \{\text{Chl}*\text{L}\} &= 3.08 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} \\ \{(\text{Chl})_2\} &= 1.14 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} \end{aligned}$$

Der Sättigungsgehalt $\{C_W\}$ von Wasser in Dodecan ist bei Zimmertemperatur (=Präparationstemperatur der Probe)

$$\{C_W\} = 6.1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$$

Da die Probe bei Zimmertemperatur präpariert und abgeschmolzen wird, gibt dieser Wert praktisch den gesamten Wassergehalt der Probe. Der mögliche zusätzliche Nukleophileintrag durch das Chlorophyll a, der im Konzentrationsbereich der Chl a-Nominalkonzentration liegt, verursacht also, wenn man ihn vernachlässigt, einen Fehler von weniger als 5%. Hiermit errechnet sich bei 328 K für die Reaktionskonstante k_3

$$k_3(328 \text{ K}) = 22.4 \text{ (l mol}^{-1}\text{)}$$

Für die "trockener" präparierte Probe aus Abb. VI.1.3(4) läßt sich somit mit den Konzentrationen $\{(\text{Chl})_2\}$ und $\{\text{Chl} \cdot \text{L}\}$ bei 328 K eine Wasserkonzentration von $\{L\} = 4.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ errechnen.

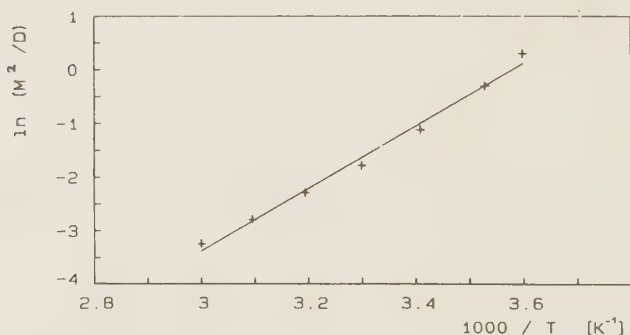


Abb. VI.1.4(2) Van't-Hoff-Diagramm zur Bestimmung der Bildungsenthalpie E zwischen $2(\text{Chl} \cdot \text{H}_2\text{O})$ und $(\text{Chl})_2 + 2\text{H}_2\text{O}$; Probe aus Abb. VI.1.3(3) (+) Meßwerte; die eingezeichnete Regressionsgerade hat eine Steigung von 5.8 ± 0.2 und entspricht $E = 4040 \text{ cm}^{-1}$

Man erhält somit mit k_3 bei 328 K eine Bestimmungsgleichung für k_0 :

$$k(328 \text{ K}) = 22.4 \text{ (l mol}^{-1}\text{)} = k_0 e^{-4040/228}$$

wobei $E = 4040 \text{ cm}^{-1}$ aus der Steigung der Geraden von $\ln(k_3)$ über $1/T$ in Abb. VI.1.4(2) bestimmt wurde.

Für k_0 ergibt sich also:

$$k_0 = 1.1 \cdot 10^9 \text{ (l mol}^{-1}\text{)}$$

Daraus errechnet sich für die Reaktionskonstante k_3 bei Zimmertemperatur

$$k_3(295 \text{ K}) = 3.1 \text{ (l mol}^{-1}\text{)}$$

übereinstimmend mit früheren Messungen der Arbeitsgruppe Molekül- und Biophysik der Universität Oldenburg / 89/.

Damit ist eine vollständige Beschreibung des Monomer/Dimer-Gleichgewichtes gegeben.

2. Fluoreszenz

2.1 Fluoreszenz der Chlorophyll a-Monomere

Die Fluoreszenz der Monomere (Chl)*L zeigt praktisch keine Abhängigkeit der Lage des Maximums, der Abklingdauer und der Quantenausbeute von Temperatur und Anregungswellenlänge.

2.1.1 Spektren

In Tabelle VI.2(1) sind die gemessenen Emissionsmaxima der Fluoreszenz von Monomeren (Chl)*L in Dodecan mit polaren Lösungsmittelanteilen (H₂O bzw. IP) für die Grenzwerte des Temperaturintervalls, in dem die Proben gemessen wurden, aufgelistet.

Lsgm.	T K	λ_{ex} cm ⁻¹	(nm)	λ_{em} cm ⁻¹	(nm)	M/S
Dodecan +H ₂ O	296	15 150	(660)	14 970	(668)	M
"	264	14 280	(700)	13 980	(715)	M
Dodecan +IP	296	15 150	(660)	14 970	(668)	M
"	264	15 150	(660)	14 970	(668)	M

Tab. VI.2(1) Emissionsmaxima der Fluoreszenz von Monomeren (Chl)*L in Dodecan + Nukleophilen; M = Maximum; S = Schulter

2.1.2 Zerfallsfunktion des S_1 -Zustands

Die Lebensdauer des S_1 -Zustandes dieser Monomere beträgt 5.94 ± 0.03 ns bei allen Temperaturen zwischen 264 K und 328 K.

Sie wird zu ca. 99% der emittierten Intensität durch ein monoexponentielles Zerfallsgesetz bestimmt. Die restliche Intensität zerfällt mit einer wesentlich kürzeren Zeitkonstante und ist eventuell auf restliche Aggregate (s. Kap. VI.1.1) zurückzuführen.

Die Quantenausbeute der (Chl)*IP-Moleküle in Dodecan, das mit 0.02 mol l^{-1} Isopropanol titriert ist, wurde mit 0.3 ± 0.03 gemessen (s. a. Kap V.2).

Abschätzungen von Quantenausbeute und Messungen der Lebensdauer der Fluoreszenz der Monomere (Chl)* H_2O ergeben die gleichen Werte wie die der Monomere (Chl)*IP. Auf Grund der Inhomogenität der Proben (s. Kap. VI.1.4) muß man jedoch eine etwas vergrößerte Fehlerbreite annehmen.

2.1.3 Polarisationsanisotropie der Fluoreszenz

Die Anfangsanisotropie r_0 der Monomere (Chl)*IP in Dodecan wurde bei 264 K mit $r_0 = 0.35 \pm 0.01$ gemessen. Anfangsanisotropiemessungen von Chl a in Dodecanol bei 303 K ergeben trotz deutlich höherer Viskosität des Lösungsmittels vergleichbare Werte für r_0 . Weiterhin zeigen Anisotropiemessungen an DQTCI mit $r_0 = 0.39 \pm 0.01$, daß der theoretisch erreichbare Wert für $r_0 = 0.4$, wenn der Winkel ξ zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment $\xi = 0$ ist, auch bei schnell relaxierenden Molekülen mit der entwickelten Meßapparatur meßbar ist.

Als Ursachen für die reduzierte Anfangsanisotropie bei Chl a-Monomeren können ausgeschlossen werden:

Reabsorption: wegen der geringen Konzentrationen der Proben ($< 10^{-5}$ mol l^{-1}),

Anregung des zu Q_y senkrecht polarisierten Q_x -Übergangs: beim Monomer $< 1\%$, da der Q_x an seinem Maximum der Absorption bei 575 nm nur ca. 10% der Q_y Extinktion bei 662 nm hat; für die beobachtete Anfangsanisotropie von $r_0 = 0.35$ müßten aber ca. 8% der Anregungsintensität in den Q_x gelangen (Gl. IV.(6))

Energietransfer auf Fremdmoleküle: aus analogen Gründen wie die Q_x -Anregung und wegen der Homogenität der Probe.

Es verbleibt nur eine Relaxation der (Chl)*L-Moleküle nach der Anregung in einen S_1 -Zustand, dessen Übergangsdipolmoment in den Grundzustand einen Winkel $\xi \approx 15^\circ$ gegenüber dem Absorptionsübergangsdipolmoment nach Gl. (IV.(3)) bildet.

Die zeitliche Änderung der Anisotropie der (Chl)*L wird durch ein monoexponentielles Gesetz gut beschrieben (s. Abb. V.3(2)). Das heißt, daß die Näherung des effektiven, rotierenden Moleküls durch ein Kugelvolumen (s. Kap. IV.3.2.2.3) befriedigend genau ist. Aus den - bei verschiedenen Temperaturen - gemessenen Depolarisationszeiten wurde für (Chl)*L aus dem Perrin-Diagramm (s. Abb. VI.2.1.3(1)) ein effektives Volumen V_M errechnet (nach Gl. IV.(4))

$$V_M = 1.2 \cdot 10^3 \text{ \AA}^3$$

Dies entspricht einem effektiven Radius ρ_M des Monomer (Chl)*IP von

$$\rho_M = 6.6 \text{ \AA}$$

Der Radius der "Makroringes" eines Chl a beträgt ca. 4 \AA / 93%. Aus der Differenz zu dem hier gemessenen Wert erkennt

man, daß der effektive Radius des rotierenden Moleküls durch das Lösungsmittel um ca. 50% vergrößert wird.

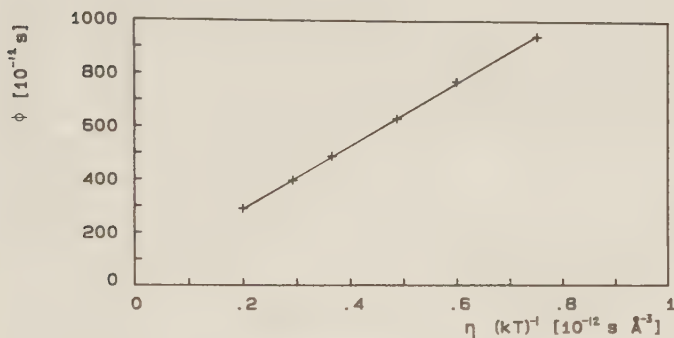


Abb. VI.2.1.3(1) Perrin-Diagramm der Fluoreszenzdepolarisationszeit ϕ von (Chl)*IP in Dodecan;
 η : Viskosität des Lösungsmittels
 k : Boltzmann-Konstante
 T : Temperatur
 aus der Steigung der Geraden ergibt sich ein
 Volumendes rotierenden Moleküls von $1200 \pm 50 \text{ \AA}^3$

Damit sind für die (Chl)*L-Monomere in Dodecan die Lebensdauer der Fluoreszenz, Quantenausbeute und Fluoreszenzanisotropie quantitativ bestimmt worden, wobei insbesondere bemerkenswert ist, daß Absorption- und Emissionsdipolmoment des Monomermoleküls von Chl a in Dodecan einen Winkel von ca. 15° bilden.

2.2 Fluoreszenz der Chlorophyll a Dimere

Seit Livingston / 41/ ist die Existenz von Chlorophyll a-Aggregaten $(\text{Chl})_2$ bekannt, die praktisch keine Fluoreszenz zeigen sollten / 33/. Im Jahre 1984 konnte jedoch gleichzeitig von zwei Gruppen die Fluoreszenz der Dimere $(\text{Chl})_2$ eindeutig nachgewiesen werden / 37/ / 38/ / 75/.

Deutlichstes Merkmal der $(\text{Chl})_2$ -Fluoreszenz ist ein Emissionsmaximum bei $14\,600\text{ cm}^{-1}$ (685 nm). Da die Stokesverschiebung der Chl a-Emission mit ca. 100 cm^{-1} in allen bekannten Fällen sehr klein ist, liegt es nahe, diese Emission der Absorptionsbande bei 678 nm ($14\,750\text{ cm}^{-1}$), d.h. dem Donor des $(\text{Chl})_2$, zuzuordnen.

Die Quantenausbeute ist jedoch gegenüber derjenigen des Monomers (0.3) drastisch reduziert.

Dies steht im krassen Widerspruch zu der Tatsache, daß der überwiegende Teil der Fluoreszenzintensität mit einer mit dem Monomer nahezu identischen Abklingdauer emittiert wird.

Es ist also notwendig, das Fluoreszenzverhalten von Chl a in unpolaren Lösungsmitteln genauer zu diskutieren.)

2.2.1 Spektren

Die Fluoreszenz der Dimere $(\text{Chl})_2$ zeigt bei Zimmertemperatur nach einer impulsförmigen Anregung unterschiedliches zeitliches und spektrales Verhalten. Sowohl die Zeitfunktion der Fluoreszenzintensität, als auch die Lage der Emissionsmaxima ist in charakteristischer Weise von der Anregungswellenlänge abhängig. Dies ist mit der Tatsache zu erklären, daß die π -Elektronensysteme der beiden Makroringsysteme, wie aus der Analyse der Absorptionsspektren hervorgeht, keine oder nur sehr geringe Wechselwirkung miteinander haben und so die beiden Teilmoleküle als 2 Chl a-Moleküle mit leicht unterschiedlicher Umgebungswchselwirkung aufzufassen sind.

Vollständig selektive Anregung der Einzelmoleküle des Dimers $(\text{Chl})_2$ ist allerdings nicht möglich.

Regt man eine Probe, die ausschließlich aus Dimeren $(\text{Chl})_2$ besteht, bei 660 nm an, geschieht die Absorption zu 75% im Akzeptormolekül und zu 25% im Donormolekül des Dimers. Diese Verteilung ergibt sich aus den approximierten Absorptionsspektren der beiden Teilmoleküle des Dimers $(\text{Chl})_2$ (s. Abb. VI.1.4(1)) und ist die maximale Selektivität, die bezüglich des Akzeptors erreichbar ist. Vorzugsweise Absorption durch den Donor erfolgt optimal mit einer Anregungswellenlänge von 680 nm, wobei man ein Verhältnis von 89% Donoranregung zu 11% Akzeptoranregung erreicht.

In Tabelle VI.2(2) sind die Emissionsmaxima der Fluoreszenz von Dimeren $(\text{Chl})_2$ in Dodecan ohne polare Lösungsmitteleanteile zusammen mit den wesentlichen Parametern bei deren Beobachtung aufgelistet. Sie wurden den direkten Fluoreszenzmessungen entnommen.

Lsgm.	T	λ_{ex} K	λ_{em} cm ⁻¹ (nm)	λ_{em} M/S	λ_{em} cm ⁻¹ (nm)	M/S
Dodecan						
trocken	264	15 150 (660)	14 970 (668)	M	14 600 (685)	S
"	296	15 150 (660)	14 950 (669)	M	14 600 (685)	S
"	328	15 150 (660)	14 925 (670)	M	14 600 (685)	S

"	264	14 700 (680)			14 580 (686)	M
"	296	14 700 (680)	14 815 (675)	M _l	14 600 (685)	M _k
"	328	14 700 (680)	14 860 (673)	M _l	14 600 (685)	M _k

Tab. VI.2(2) Emissionsmaxima der Fluoreszenz von $(\text{Chl})_2$ in Dodecan; M = Maximum; S = Schulter;
 M_k = Maximum der schnell relaxierenden Komponenten;
 M_l = Maximum der langsam relaxierenden Komponenten

Durch genaue Analyse und Vergleich der Messungen lassen sich Fluoreszenzspektren charakterisieren, die nahezu die homogene Struktur (nur eine Emissionsbande im Bereich zwischen 660 nm und 700 nm) der Monomerfluoreszenz zeigen, allerdings in der Wellenzahlenskala leicht verschoben sind. Diesen homogenen Spektren lassen sich dann die in der Tabelle VI.2(2) angegebenen Emissionsmaxima in definierter Weise zuordnen. Im Folgenden wird die Darstellung der homogenen Spektren aufgezeigt:

Das Spektrum der Fluoreszenzkomponente mit dem Maximum bei **668 nm** wird durch die Emission bei 328 K im F_5 -Zeitfenster (S. Abb. V.2(12) dargestellt ($\lambda_{\text{ex}} = 660 \text{ nm}$).

Das Spektrum der Komponente mit dem Fluoreszenzmaximum bei **685 nm** ist dann zu beobachten, wenn bei 680 nm und einer Probertemperatur von 264 K angeregt wird (s. Abb. V.2(15)).

Das Spektrum der Fluoreszenzkomponente, die ihr Maximum bei **672 nm** hat, wird durch die F_5 -Emission bei 328 K und einer Anregungswellenlänge von 680 nm gegeben.

Die **Spektren der kurzen Komponenten** werden separiert, indem von den F_1 -Zeitfensterspektren anteilig das Spektrum der langlebigen Komponente - bestimmt im Zeitfenster F_5 - subtrahiert wurde (s. Kap. IV.3.2.2). Man erhält hierdurch **für alle Anregungswellenlängen** den gleichen spektralen Verlauf mit einem **Emissionsmaximum bei 685 nm** (s. Abb. VI.3(2)). Dieser ist identisch mit dem des Fluoreszenzspektrums bei 264 K, wenn die Probe bei 680 nm angeregt wird (s. Abb. V.2(15))!

2.2.2 Zerfallsfunktionen des S_1 -Zustandes

Die Messung der Fluoreszenzlebensdauern erfolgte an den Maxima der Emission bei 668 nm, 672 nm und 685 nm.

Es lassen sich für die Messungen bei allen Temperaturen befriedigende Fits nur unter der Annahme der Überlagerung von mindestens drei exponentiellen Zerfällen gewinnen. Tab. VI.2(3) gibt die Parameter für die besten 3-Komponenten-Fits an. Man findet bei allen Temperaturen eine relativ intensive, langlebige Komponente von ca. 6 ns. Diese kann mit hoher Genauigkeit bestimmt werden, weil sie für Zeiten > 4 ns praktisch ausschließlich die Zerfallsfunktion darstellt. Im Zeitbereich < 2 ns ist in den Abklingkurven z.T. bedeutende zusätzliche Fluoreszenz zu beobachten.

Da mehr exponentielle Fitansätze keine eindeutigen Lösungen ergeben, sind die Amplituden p_i und die Zeitkonstanten τ_i der kürzeren Komponenten mit relativ großen Variationsmöglichkeiten behaftet. Unter der Annahme, daß es sich bei der Zeitfunktion um die Superposition von monoexponentiellen Zerfällen handelt, findet man jedoch, daß die auftretenden Zeitkonstanten in drei Gruppen (kurz (< 100 ps), mittel (ca. 1 ns) und lang (ca. 6 ns)) zu sortieren sind, da sie sich stark unterscheiden.

Das heißt zwar, daß eine Identifizierung von Komponenten innerhalb einer Gruppe von Lebensdauern nur durch die Zeitanalyse nicht eindeutig möglich ist, eine Untersuchung der Kinetik der drei Gruppen selbst aber doch durchgeführt werden kann.

T K	λ_{ex} nm	λ_{em} nm	P1	τ_1 ps	P2	τ_2 ps	P3	τ_3 ps
264	660	668	145	5912	13,5	1094	40	106
264	660	685	50	6008	35,9	947	43	147
264	680	672	39,3	6099	16,9	844	34	113
264	680	685	108	6041	45,8	928	96	101
273	660	668	121	5953	15,1	1246	36,7	97
273	660	685	36	5996	31,9	1002	42,8	200
273	680	672	30,4	6117	19,8	826	18,8	133
273	680	685	62,1	5880	34,8	1017	101	145
287	660	668	98	5900	19	800		
287	660	685	31,4	5860	34,9	830	40	150
287	680	672	24,4	6200	16,2	960	47	120
287	680	685	39,7	5880	34,4	1013	79,4	146
296	660	668	83,1	5953	18,1	938	28,6	134
296	660	685	25,6	5780	33,5	801	34	178
296	680	672	23,4	6103	18,6	847	37,6	111
296	680	685	25,1	5657	35,5	903	74	128
328	660	668	87,1	5870	17	1180	110	81
328	660	685	26,2	5820	37,2	882	97	131
328	680	672	24,3	6200	21,5	967	74,3	120
328	680	685	17,5	5679	44,2	913	125	100

Tab. VI.2(3) Parameterwerte der 3 - Exponentialfunktionen-
Analyse der Fluoreszenzabklingkurven von (Chl)₂
in Dodecan (trocken)

Auf Grund der Möglichkeit, die homogenen Spektren darstellen zu können, kann die Analyse der Fluoreszenzabklingkurven optimiert werden. Den einzelnen homogenen Spektren kann jeweils mindestens ein Zerfallsgesetz des angeregten Zustands der zugehörigen Spezies zugeordnet werden. Die Überlagerung der Emission der verschiedenen Spezies an den Wellenlängen der Zerfallskurvenmessung kann deshalb durch geeignete Subtraktion reduziert werden (Bandenkorrektur).

Die Fluoreszenzabklingfunktion $F(t, \lambda)$ bei einer Wellenlänge λ kann als Summe der Emissionen aller n Komponenten der Lösung dargestellt werden:

$$F(t, \lambda) = \sum_{i=1}^n \gamma_i(\lambda) F_i(t, \lambda_{\max})$$

wobei $F_i(t, \lambda_{\max})$ die Emission der Spezies i ist und am Maximum $\lambda_{\max}$ des homogenen Spektrums der reinen Komponente i gemessen wird. Der Wichtungsfaktor γ_i errechnet sich entsprechend

$$\gamma_i(\lambda) = \frac{F_i(\lambda)}{F_i(\lambda_{\max})}$$

aus den Intensitäten $F_i(\lambda)$ der homogenen Spektren.

Da die Emissionen, entsprechend den experimentellen Befunden, durchweg aus nur zwei Spektren zusammengesetzt sind, erhält man die Fluoreszenzabklingfunktion jeweils einer Komponente k in erster Näherung aus

$$F_k(t, \lambda_k) \approx F(t, \lambda_k) - \gamma_j(\lambda_k) F(t, \lambda_j) ; (j \neq k)$$

wenn γ_i klein gegen 1 ist.

Korrigiert man die Abklingkurven nach diesem Verfahren, so erhält man als beste Fits wiederum Summen von bis zu drei Exponentialfunktionen, die jedoch insgesamt deutlich homogener in den Zeitkonstanten τ_i (s. Tab. VI.2(4)) als die

Werte der Analysen der Originalmessungen (Tab. VI.2(3)) sind. Diese korrigierten Werte wurden zur Interpretation der Fluoreszenz der Dimere $(\text{Chl})_2$ verwendet.

T K	λ_{ex} nm	λ_{em} nm	P1	τ_1 ps	P2	τ_2 ps	P3	τ_3 ps
264	660	668	45	5936	2,3	1522	10,9	88
264	660	685	11,5	6010	14,5	867	14,4	134
264	680	672	---	----	----	----	----	---
264	680	685	35,7	5986	14,8	909	35,1	94
273	660	668	30,4	5954	3,1	1160	8,6	111
273	660	685	0,69	5411	10,9	916	14,8	163
273	680	672	2,69	6921	0,89	968	0,53	138
273	680	685	18,9	5776	13,5	882	31,9	102
287	660	668	30,4	5955	3,1	1152	9,0	100
287	660	685	0,71	5244	10,1	946	14,4	195
287	680	672	3,45	6731	1,1	1039	4,2	100
287	680	685	11,5	5567	12,2	847	24,7	113
296	660	668	26,2	5962	3,13	1200	14,6	100
296	660	685	- 0,1	6540	10,1	896	14,5	183
296	680	672	4,9	6504	1,58	964	4,82	110
296	680	685	5,5	5113	10,6	871	26,6	106
328	660	668	27,3	5913	3,8	1345	16,7	79
328	660	685	----	----	14,5	791	18,4	171
328	680	672	6,3	6463	2,8	1074	8,1	111
328	680	685	2,6	3765	12,0	872	30,7	120

Tab. VI.2(4) Parameterwerte der 3 - Exponentialfunktionen-Analyse der bandenkorrigierten (s. Text) Fluoreszenzabklingkurven von $(\text{Chl})_2$ in Dodecan (trocken)

2.2.3 Fluoreszenzanisotropie

Die Anfangsanisotropie r_0 der $(\text{Chl})_2$ -Fluoreszenz ist ebenso wie die Fluoreszenz selbst sehr uneinheitlich (s. Kap. V.3.2). Je nach Anregungswellenlänge und Temperatur wurden zum Teil erheblich unterschiedliche Werte gemessen.

Die Depolarisation $r(t)$ der Fluoreszenz der $(\text{Chl})_2$ zeigt, im Gegensatz zu der der Monomere $(\text{Chl})^*L$ keinen monoexponentiellen Verlauf.

Die Depolarisationsspektren der Fluoreszenz geben einen ersten Hinweis auf die Ursachen für diese Inhomogenität. Das F_1 -Anisotropiespektrum der Dimere $(\text{Chl})_2$ zeigt neben relativ hohen Anfangsanisotropiewerten auch nahezu vollständige Isotropie bei 685 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 660$ nm; Abb. V.3(3)) und bei 660 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 680$ nm; Abb. V.3(6)). Es ist also in den Depolarisationsmessungen - ebenso wie in den Fluoreszenzmessungen - eine Bandenkorrektur (s. Kap. VI.2.2) der Messungen für eine korrekte Analyse des Zeitverhaltens notwendig.

Die korrigierten Depolarisationskurven der Emission bei 668 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 660$ nm) lassen sich mit monoexponentiellen Zerfallsfunktionen fitten. Die Anfangsanisotropie r_0 erreicht mit $r_0 = 0.3 \pm 0.02$ nicht ganz den Wert des Monomeren $(\text{Chl})^*L$ von 0.35. Mit zunehmender Temperatur nimmt die Anfangsanisotropie weiter auf ca. 0.2 ab.

Die Auftragung der bei verschiedenen Temperaturen gemessenen Depolarisationszeiten ϕ_D im Perrin-Diagramm (s. Abb. VI.2.2.3(1)) ergeben ein effektives Rotationsvolumen V_D dieser Spezies von

$$V_D = 1.9 \cdot 10^3 \text{ \AA}^3$$

was bei Annahme eines Kugelvolumens einem Radius ρ_D von

$$\rho_D = 7.7 \text{ \AA}$$

entspricht. Diese Werte sind deutlich höher als die des Monomeren und beweisen, daß die entsprechende Emission aus einem größeren Molekül stammen muß.

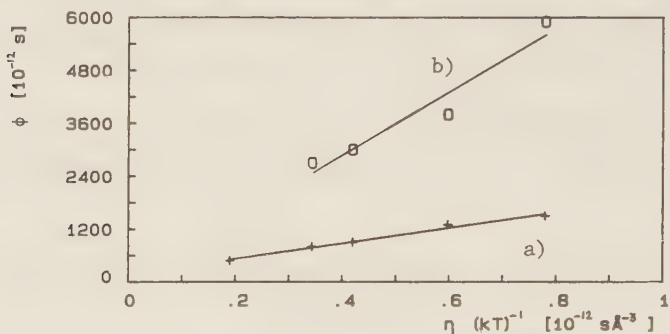


Abb. VI.2.2.3(1) Perrin-Diagramm der Fluoreszenzdepolarisationszeit ϕ von $(\text{Chl})_2$ in Dodecan;
 a) λ_{ex} : 660 nm; λ_{em} : 668 nm;
 b) λ_{ex} : 680 nm; λ_{em} : 685 nm (langsame Komponente, s. Text);
 η : Viskosität des Lösungsmittels
 k : Boltzmann-Konstante
 T : Temperatur
 Die Steigungen der jeweiligen Geraden entsprechen Volumina der rotierenden Moleküle von $1900 \pm 100 \text{ \AA}^3$ bzw. $7200 \pm 500 \text{ \AA}^3$

Die Depolarisation der Emission bei 685 nm (λ_{ex} =660 nm) zeigt nach der Bandenkorrektur bei 264 K eine negative Anfangsanisotropie von ca. $r_0 = -0.18$ (s. Abb. VI.3(3)), mit einer vergleichbaren Zeitkonstante von 1.5 ns wie $\phi_D(\lambda_{\text{ex}}=660 \text{ nm}; \lambda_{\text{em}}=668 \text{ nm})$. Im weitergehenden Zeitverlauf wird $r(t)$ positiv und zeigt eine zusätzliche Zeitkonstante von ca. 6 ns. Auf Grund des schlechten Signal-/Rauschverhältnisses - durch die abnehmende Fluoreszenzintensität und die kürzere Depolarisationszeit bedingt - liefern die Messungen bei höheren Temperaturen nicht mehr genügend statistische Sicherheit für quantitative Messungen, die in einem Perrin-Diagramm verwendet werden könnten. Tendenziell läßt sich jedoch sagen, daß

beide Depolarisationszeiten sich mit zunehmender Temperatur verkürzen und der Beitrag der langsamen Komponente deutlich zurückgeht.

Die Depolarisationsmessungen der Emission bei 685 nm ($\lambda_{\text{ex}}=680$ nm) sind auch nach der Bandenkorrektur deutlich biexponentiell (s. Abb. VI.3(2)) mit einer Depolarisationszeitkonstanten von ca. 1.4 ns und einer von ca. 6 ns. Die zugehörigen Anfangsanisotropiewerte r_0 nach Gl. IV.(5) sind 0.3 für die schnelle und 0.1 für die langsame Komponente. Auch hier wird der Beitrag der langsam depolarisierenden Komponente mit der Temperatur deutlich zurückgedrängt, so daß insgesamt die Anfangsanisotropie mit zunehmender Zeit auf 0.3 zunimmt. Das Perrin-Diagramm der schnell depolarisierenden Komponente liefert die gleichen Werte für den Molekülradius ρ_D wie oben (hier nicht gezeigt).

Auch hier konnten wegen des schlechten Singal-/Rauschverhältnisses im Bereich höherer Temperaturen für die lange Komponente keine Meßpunkte für ein sinnvolles Perrin-Diagramm gewonnen werden. Die Punkte bei niedrigen Temperaturen (s. Abb. VI.2.2.3(1)) ergeben ein effektives Rotationsvolumen von

$$V_D' = 7200 \pm 500 \text{ \AA}^3$$

und demzufolge einen effektiven Radius ρ_D' von

$$\rho_D' = 12 \text{ \AA}$$

Die Depolarisation der Komponente, deren Emissionsmaximum bei 672 nm liegt ($\lambda_{\text{ex}}=680$ nm) zeigt eine Anfangsanisotropie bei allen gemessenen Temperaturen von $r_0 = 0.1 \pm 0.02$. Die Zeitkonstante ϕ der Depolarisationsfunktion liegt im Bereich der Zeitkonstanten der Emission bei 668 nm ($\lambda_{\text{ex}}=660$ nm). Wegen der hohen Isotropie ist die Unsicherheit in deren Bestimmung jedoch sehr groß, so daß auf ein eigenes Perrin-Diagramm für diese Komponente verzichtet werden muß.

3. Interpretation des Chlorophyll a-in vitro-Systems

Die vorliegenden Meßdaten zeigen, daß die Fluoreszenz der Lösungen von Chlorophyll a in Dodecan nicht von einer einzelnen Spezies stammen kann. Mit den Fluoreszenzmessungen können neben den Dimeren $(\text{Chl})_2$ noch mindestens 3 weitere Aggregationsformen von Chlorophyll a - hier mit DCI bis DCIII benannt - mit zum Teil erheblich unterschiedlichen Eigenschaften nachgewiesen werden.

Sie werden durch die jeweiligen Wellenlängen des Emissionsmaximums und der Lebensdauer der Fluoreszenz charakterisiert:

Spezies	DCI	λ_{em} : 672 nm; τ : 6.5 ns
"	DCII	λ_{em} : 668 nm; τ : 5.95 ns
"	DCIII	λ_{em} : 685 nm; τ : 6.0 ns - 3.8 ns
"	$(\text{Chl})_2$	λ_{em} : 685 nm; τ : 0.9 ns

Im Folgenden werden diese 4 Spezies genauer diskutiert.

DCI

Man beobachtet mit zunehmender Temperatur eine intensiver werdende Emissionsbande bei 672 nm, dann und nur dann, wenn die Anregung bei 680 nm erfolgt.

Die Lebensdauer von 6.5 ns dieser Emission ist bei allen Temperaturen im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant, zeigt jedoch auch kürzerlebige Anteile in der Größenordnung von ca. 10% der Gesamtintensität (s. Tab.VI.2(4)).

Das homogene Spektrum der Spezies DCI der zeitaufgelösten Fluoreszenz im F_5 -Zeitfenster bei 328 K hat die Form eines um 4 nm rot verschobenen Monomerspektrums.

Die Anfangsanisotropie r_0 ist ca. 0.1, das entspricht einem Winkel ξ zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment von ca. $\xi \approx 45^\circ$. Die Rotationsdepolarisationszeit ϕ zeigt im Rahmen der Meßgenauigkeit den gleichen Temperaturgang, der auf ein größeres Molekül als der Monomer schließen läßt, wie die Spezies DCII (s. unten).

Ein Maß für die Konzentration der DCI ist - bei konstanter Absorption - die Besetzungsdichte N_0 des angeregten Zustandes. Direkt meßbar ist jedoch nur die Fluoreszenzintensität $F(t)$, die proportional zur Besetzungsdichte N_0 und der Fluoreszenzrate k_{f1} ist. Zum Zeitpunkt $t=0$ gilt

$$F(0) \sim k_{f1} N_0$$

und mit $QE = k_{f1} \tau$ zeigt sich, daß wegen

$$F(0) \tau QE^{-1} \sim N_0 \quad (\text{VI.}(1))$$

die Fluoreszenzintensitätsamplitude $F(0)$ ($F(0) = p$ für mono-exponentiellen Zerfall) nur dann proportional zur Besetzungsdichte N_0 ist, wenn

$$\tau QE^{-1} = \text{const.}$$

In erster Näherung kann man annehmen, daß die Fluoreszenzraten k_{f1} der DCI Spezies und des Monomeren ungefähr gleich sind, da die Lebensdauern τ nahezu gleich sind. Dann ergibt sich das Verhältnis der Besetzungsdichten (d.h. der Konzentrationen) aus dem gemessenen Verhältnis der Amplituden p ($P_M : P_{DCI} \approx 100 : 1$). Das bedeutet, daß die Konzentration $\{DCI\}$ bei allen gemessenen Temperaturen unterhalb von 1% der Konzentration $\{Chl\}_2$ ist. Aus diesem Grunde kann das Absorptionsspektrum der DCI nicht dargestellt werden.

Die gemessene Intensitätszunahme zeigt sich ausschließlich in ansteigenden Amplituden p_i (s. Tab.VI.2(4) und nicht durch Zunahme der Lebensdauern τ_i . Das heißt, da k_{f1} als konstant angenommen werden kann, die Besetzungsdichte N_0 wächst mit zunehmender Temperatur: die Konzentration dieser Spezies $\{DCI\}$ nimmt also mit steigender Temperatur zu.

Trägt man als Maß für die Konzentration dieser Spezies $\{DCI\}$ den natürlichen Logarithmus des Produktes aus Lebensdauer und Amplitude dieser langen Komponente über der reziproken Tem-

peratur im Sinne eines Van't-Hoff-Diagramms auf (s. Abb. VI.3(1)), so liegen die Werte auf einer Geraden mit der Steigung -1000 cm^{-1} , was die Bildungsenthalpie dieser Spezies darstellt. Hierbei wird angenommen, daß die Konzentrationen der Ausgangsspezies konstant bleiben und somit die Steigung der Geraden nicht beeinflussen.

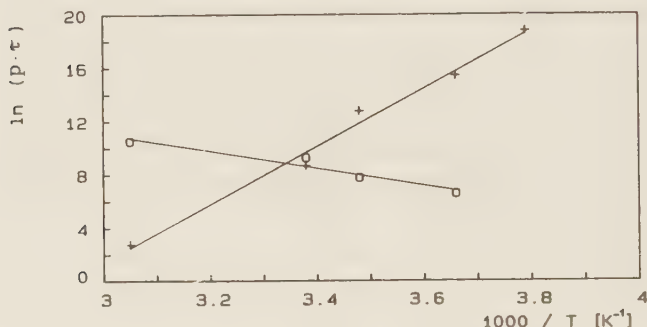


Abb. VI.3(1) Van't-Hoff-Diagramm aus der Fluoreszenzintensität als Maß für die Konzentration von Chl a-

(o)- DCI ;

(+) - DCIII ;

Die Steigungen der zugehörigen Geraden ergeben die Bildungsenthalpien $E_{\text{DCI}} = -1000 \text{ cm}^{-1}$ und $E_{\text{DCIII}} = 4000 \text{ cm}^{-1}$

Messungen mit verschiedenen Nukleophilkonzentrationen zeigen, daß die Bildung der DCI außer bei höheren Temperaturen auch bei etwas höheren Konzentrationen der Nukleophilen im Lösungsmittel begünstigt wird. Bei bereits geringfügig höherem Nukleophilgehalt wird die Emission bei 672 nm auch schon bei niedrigeren Temperaturen beobachtet.

Hervorstechende Eigenschaft der DCI Moleküle ist, daß deren Emission nur bei Anregung im Bereich von 680 nm beobachtet wird.

Eine vollständige Charakterisierung der Spezies DCI läßt sich mit den vorliegenden Daten nicht durchführen.

Die Lage des Maximums der Emissionsbande bei 672 nm spricht für die Zuordnung zu dem Akzeptormolekül eines Dimers (Chl), dessen π -Elektronensystem jedoch stärker gestört wäre als das des Akzeptormoleküls, dessen Emission bei 668 nm liegt. Im Widerspruch hierzu steht jedoch die Tatsache, daß diese Emission nicht bei 660 nm resonant angeregt werden kann.

Der gleiche Widerspruch spricht gegen die Annahme, daß es sich um ein weniger gestörtes Donormolekül handelt. Weiterhin sollte ein solches Molekül bei der Anregungswellenlänge 634 nm ähnlich selektiv angeregt werden wie die bei 685 nm emittierenden $(\text{Chl})_2$. Im F_5 -Spektrum ist jedoch bei dieser Anregung nur die 668 nm Bande zu erkennen.

Von dem Molekül DCI kann jedoch mindestens gesagt werden, daß es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Dimermolekül handelt, das mit einem oder mehreren Nukleophilen einen Komplex bildet.

DCII

Das reine Emissionsspektrum der bei 668 nm maximal fluoreszierenden Spezies DCII wird wohl am besten im F_5 -Zeitfenster bei 328 K wiedergegeben ($\lambda_{\text{ex}}=660$ nm). Die Form dieses Spektrums ist nahezu identisch mit der Fluoreszenz der Monomere $(\text{Chl})^*\text{L}$.

Die Lebensdauer des angeregten Zustandes der DCII ($\tau=5.94$ ns) ist ebenfalls die der Monomere.

Weiterhin ist die Anfangsanisotropie $r_0 = 0.3$ nahezu gleich derjenigen des Monomeren.

Es muß sich jedoch bei der Spezies DCII aus mehreren Gründen um Dimere des Chl a handeln:

Zunächst zeigen die Absorptionsspektren keinen Anhalt für restliche Monomere in geeignet trocken präparierten Proben. Weiterhin ist die Bildung von Dimeren mit steigender Temperatur sehr effektiv (s. Kap. VI.1.4). Die Intensität der Emission dieser Spezies DCII ändert sich mit steigender Temperatur aber nur sehr wenig, d.h. die Konzentration dieser Spezies bleibt nahezu konstant.

Zum Anderen ergibt sich aus dem Perrin-Diagramm (s. Abb. VI.2.2.3(1) der Depolarisationszeiten ϕ bei den gemessenen Temperaturen ein Rotationsvolumen der DCII von $V_D = 1900 \text{ \AA}^3$, das deutlich größer ist, als das der Monomere von $V_M = 1200 \text{ \AA}^3$.

Schließlich erkennt man im Absorptionsspektrum der Monomere $(\text{Chl})^*L$ (s. Abb. V.1(1)), daß bei 680 nm noch ca. 14% der 660 nm Absorption vorhanden ist. Da der Monomer $(\text{Chl})^*L$ aber nahezu monoexponentiell mit ca. 6 ns relaxiert, müßte, wenn bei 680 nm angeregt wird, bei 264 K im zeitaufgelösten F_5 -Spektrum gegenüber dem, durch die kurzlebigen Komponenten dominierten, F_1 -Spektrum bei 668 nm eine relative Erhöhung der Intensität erkennbar sein. Dies ist jedoch nicht der Fall (s. Abb. V.2(15)).

Die langlebige Fluoreszenzbande bei 668 nm ist demnach auch einem $\text{Chl } a$ -Dimermolekül zuzuordnen. Dies muß sich jedoch von der Mehrzahl der $(\text{Chl})_2$ unterscheiden, da die Lebensdauer, die identisch der Monomerlebensdauer ist, auch auf eine vergleichbare Quantenausbeute schließen läßt.

Vergleichsmessungen mit der Fluoreszenzintensität des Monomeren zeigen jedoch, daß die gesamte Fluoreszenz, die bei 660 nm Anregung in "trockenen" Proben beobachtet wird, bei gleich großer Absorption nur ca. 4% der Monomer-Intensität ist. Da aber aus der Zeitanalyse hervorgeht, daß ca. 95% der Fluoreszenz monoexponentiell mit 6 ns Lebensdauer aus der Bande bei 668 nm stammt, muß diese Fluoreszenz einer ausge-

zeichneten Gruppe der Dimeren entstammen, die zu maximal 4% der Chl a-Konzentration vorhanden ist(s. Gl. VI.(1)). Die Wechselwirkung der beiden Teilmoleküle der Spezies DCII im angeregten Zustand muß drastisch kleiner sein als die der (Chl)₂ (s. unten), da ein Energieübertrag als Fluoreszenz bei 685 nm mit der Zeitkonstanten des DCII beobachtbar sein müßte. Eine solche Wechselwirkung würde weiterhin, wegen der kurzen Lebensdauer des elektronischen Zielzustandes, einen effektiven Quenchmechanismus mit resultierender Verkürzung der Lebensdauer darstellen.

Die Spezies DCII kann also als das Akzeptormolekül einer geringkonzentrierten (Chl)₂-Population identifiziert werden, die im angeregten Zustand, ebenso wie die überwiegende Mehrzahl der Dimere im Grundzustand, keine meßbare Wechselwirkung zwischen den Teilmolekülen zeigt.

DCIII

Das homogene Spektrum der DCIII ist identisch mit dem der (Chl)₂ und ist durch die langsamste Emission bei 264 K ($\lambda_{\text{ex}}=680$ nm) gegeben(s. V.2.3(9) Kurve F₅).

Die Lebensdauer dieser Spezies ist temperaturabhängig und ändert sich zwischen 264 K und 328 K von 6.0 ns auf 3.8 ns. Gleichzeitig verringert sich die Amplitude p der monoexponentiell zerfallenden Kurve auf weniger als 1/10 des Maximalwertes bei 264 K (s. Tab. VI.2(4)).

Da das Spektrum der Spezies DCIII identisch ist mit dem der (Chl)₂ (s. Abb. VI.3(2) und (3)), liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei DCIII und (Chl)₂ um ein und die selbe Spezies handelt.

Die Eigenständigkeit der DCIII Spezies läßt sich jedoch deutlich an der Depolarisationskurve der bei 680 nm angeregten Fluoreszenz zeigen. Der Anisotropiezerfall der Fluoreszenz bei 685 nm ist ausgeprägt biexponentiell (s. Abb.VI.3(5)). In guter Näherung kann man bei 264 K zwei deutlich unterschied-

liche Komponenten unterscheiden:

- eine kurze Komponente mit einer Zerfallszeit von ca. 1.4 ns und einer Anfangsanisotropie von ca. 0.30
- und eine bedeutend längere Komponente mit einer Zeitkonstanten von ca. 6 ns und einer Anfangsanisotropie von nur ca. 0.1 (s. Abb. VI.3(5)).

Mit zunehmender Temperatur wird die kurze Komponente der Depolarisationskurve dominant.

Die Zeitkonstante ϕ der längeren Komponente geht außerdem stark zurück (auf ca. 3 ns bei 328 K).

Durch die außerordentlich lange Zerfallszeit ϕ kann diese Komponente zweifelsfrei der langlebigen Fluoreszenz bei 685 nm zugeordnet werden.

Dies erklärt das Ansteigen der Anfangsanisotropie gemessen bei $\lambda_{em}=685$ nm ($\lambda_{ex}=680$ nm) mit zunehmender Temperatur.

Im Widerspruch zu der Annahme, daß diese langlebige Fluoreszenzkomponente mit dem Emissionsmaximum bei 685 nm die Fluoreszenz des $(Chl)_2$ darstellt, steht weiterhin die Messung der Quantenausbeute. Die Fluoreszenzintensität dieser DCIII-Dimere entspricht bei Raumtemperatur einer maximalen Konzentration an Monomeren von 2%. In geeignet "trocken" präparierten Proben bleibt jedoch im betrachteten Temperaturbereich, wie aus den Absorptionsspektren (s. Abb. V.1(4)) hervorgeht, die Konzentration der Dimere konstant, während die Intensität der DCIII sogar abnimmt.

Es liegt deshalb die Vermutung nahe, daß die langlebige Komponente einer geringkonzentrierten Spezies entstammt, deren Absorptionsspektrum zudem kaum Unterschiede zu den Dimeren $(Chl)_2$ zeigt.

Aus $r_0 = 0.1$ ergibt sich zwischen den Richtungen der Dipolmomente von Absorption und Emission der Spezies DCIII ein Winkel $\xi \approx 45^\circ$.

Die lange Rotationsdepolarisationszeit legt den Schluß nahe,

daß das DCIII-Molekül entweder in seiner Rotation stark behindert ist durch Konformationsänderung und Wegfall der bevorzugten Rotationsachse oder es sich um ein Aggregat höherer Ordnung handelt, was jedoch nach dem heutigen Stand des Wissens über das Aggregationsverhalten von Chl a in unpolaren Lösungsmitteln als höchst unwahrscheinlich anzusehen ist. Die Hypothese der Konformationsänderung im angeregten Zustand wird durch den beobachteten Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment erhärtet.

Als mögliche Spezies DCIII neben den "trockenen" Dimeren $(\text{Chl})_2$ ist zum Beispiel auch eine Spezies nicht unwahrscheinlich, deren Mg-Zentralatom im Donormolekül mit einem Nukleophil eine weitere Koordination bildet, und somit ähnliche Koordinationseigenschaften hat wie der pentakoordinierte Chl a-Monomer. Weiterhin spricht die ebenfalls hohe QE der pentakoordinierten Chl a-Moleküle für einen derartigen Mechanismus. Die gegenüber einem Monomer zusätzliche Bindung des Donormoleküls mit der C₉-Ketogruppe an das Partnermolekül sollte dann für die Rotverschiebung der Emission gegenüber der Monomeremission verantwortlich sein.

Aus Gl VI.(1) folgt, wenn für alle gemessenen Temperaturen

$$k_{fl} \sim (\tau)^{-1}$$

gilt, daß die Besetzungsdichte N_0 und damit die Konzentration der DCIII proportional zu $p \cdot \tau$ ist.

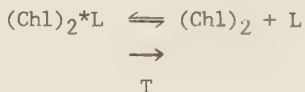
Ein Van't-Hoff-Diagramm dieser Fluoreszenz liefert aus der Steigung der resultierenden Geraden eine Bindungsenthalpie von ca. 3000 cm^{-1} (s. Abb. VI.3(1)).

Der hervorragend lineare Verlauf im Van't-Hoff-Diagramm bestätigt die ad hoc-Annahme, daß sich die QE dieser Spezies nicht im Temperaturmeßbereich ändert.

In Absorptionsmessungen von Proben mit deutlichem Nukleophil-

gehalt kann die starke Temperaturabhängigkeit des Bildungs-gleichgewichtes zwischen $(\text{Chl})_2 + 2\text{L}$ und $2(\text{Chl}*\text{L})$ bestimmt werden (s. Kap. VI.1.4). Als Bildungsenthalpie E ergab sich $E = 4040 \text{ cm}^{-1}$. In der entsprechenden Reaktion wird die Penta-koordination des Mg-Zentralatoms zweier Monomere mit L (IP oder H_2O) gelöst, eine Ketogruppe geht eine Ligation mit einem Mg-Zentralatom ein und zwei H_2O gehen "frei" in die Lösung. Die Entropie des Systems wächst mit höherer Temperatur (2 Moleküle gehen über in drei Moleküle).

Die Bildungsenthalpie der DCIII hat etwa den gleichen Betrag wie die Bildungsenthalpie der $(\text{Chl})_2$, so daß der Mechanismus einer Koordinationsänderung am Mg-Zentralatom durchaus als wahrscheinlich angenommen werden kann. Da die Reaktion in die andere Richtung abläuft, ist davon auszugehen, daß bei der betreffenden - wegen der vergleichbaren Enthalpie E - ähnlichen Reaktion mit zunehmender Temperatur (mindestens) eine Ligation des Mg-Zentralatoms gelöst wird. Wegen der größeren Entropie bei höheren Temperaturen, ist außerdem zu erwarten, daß die Zahl der Teilchen des Gleichgewichtsystems mit der Temperatur eventuell auch größer wird. Für eine solche Reaktion wird folgendes Modell vorgeschlagen, das diese Bedingungen erfüllt (siehe Kap.VI.1.1)



Als Modell für den DCIII wird also ein $(\text{Chl})_2$ ähnliches Chl a-Dimermolekül vorgeschlagen, bei dem das tetrakoordinierte Mg-Zentralatom des Donors durch ein Nukleophil penta-koordiniert ist.

(Chl)₂

Das gleiche Spektrum wie das der DCIII, das mit großer Wahrscheinlichkeit der langlebigen Fluoreszenz eines monoligierten Chl a-Dimeren zugeordnet werden kann (s. oben), wird auch von einer Komponente mit bedeutend kürzeren Relaxationszeiten gemessen. Es kann mit großer Sicherheit dem (Chl)₂ zugeordnet werden.

Das Spektrum der (Chl)₂-Dimere wird im F₁ Zeitfenster sowohl bei Anregung im Akzeptormolekül (λ_{ex} =660 nm) als auch bei Anregung im Donormolekül (λ_{ex} =680 nm) beobachtet. Abb. VI.3(2) bzw. VI.3(3) geben die entsprechenden Spektren nach Subtraktion der langlebigen Komponenten an.

Die Lage des Emissionsmaximums bei 685 nm zeigt, daß die Fluoreszenz des Dimers (Chl)₂ aus dessen Donormolekül kommt (Absorptionsmaximum bei 678 nm).

Die Intensität der Fluoreszenz skaliert mit dem Absorptionsspektrum der (Chl)₂.

In den Abb. VI.3(2) bzw. VI.3(3) entspricht das Verhältnis der Extinktionen ϵ_i der gezeigten Probe an den Anregungswellenlängen

$$\frac{\epsilon_{680}}{\epsilon_{660}} = \frac{0.782}{0.606} \approx 1.3$$

dem Verhältnis der Fluoreszenzmaxima

$$\frac{F(680)}{F(660)} = \frac{2000}{1500} \approx 1.3$$

Weiterhin skaliert die Fluoreszenzintensität linear mit der Dimerkonzentration unterschiedlicher Meßproben (hier nicht gezeigt).

Wird die Temperatur von trockenen Proben variiert, ändert

sich die Intensität der Fluoreszenz des Dimers $(\text{Chl})_2$ nicht, analog zu dessen unveränderter Konzentration, wie sie in Absorption gemessen wird.

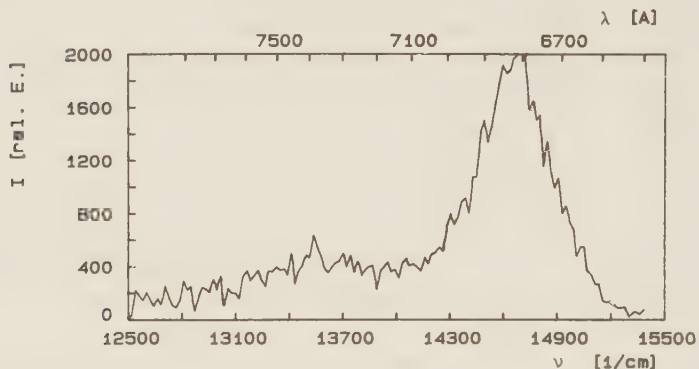


Abb. VI.3(2) Spektraler Verlauf der Fluoreszenzintensität von $(\text{Chl})_2$ in Dodecan im Zeitbereich F_1 nach Subtraktion der anteiligen langlebigen Komponenten bei 328 K (Anregung bei 680 nm)

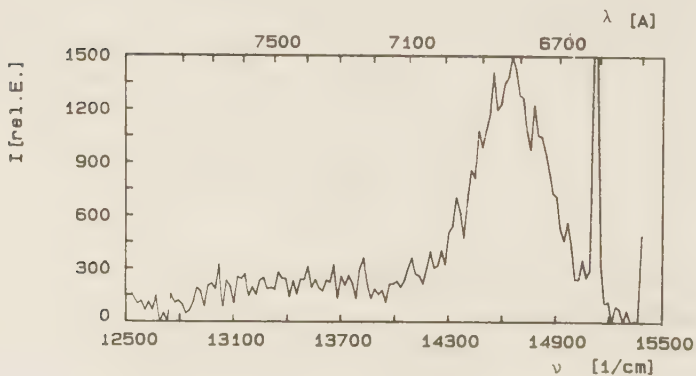


Abb. VI.3(3) Spektraler Verlauf der Fluoreszenzintensität von $(\text{Chl})_2$ in Dodecan im Zeitbereich F_1 nach Subtraktion der anteiligen langlebigen Komponenten bei 328 K (Anregung bei 660 nm)
Intensitätseinheiten wie in Abb. VI.3(2)

Die Zerfallskurve der Fluoreszenz der Dimere $(\text{Chl})_2$ sieht wie in Abb. VI.3(4) gezeigt aus. Im Rahmen der Meßgenauigkeit wird sie durch eine biexponentielle Zerfallsfunktion beschrieben. Ein Anklingen der Intensität ist im Rahmen der gegebenen Meßgenauigkeit nicht auflösbar.

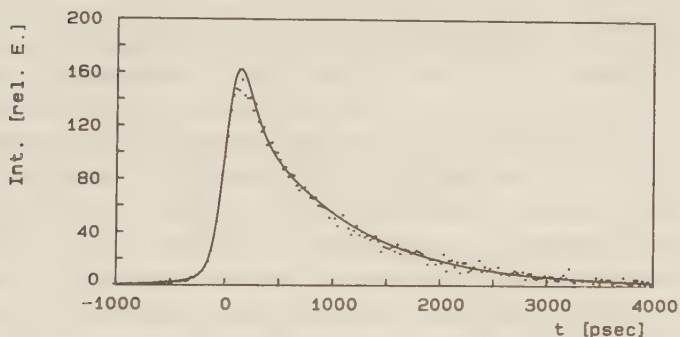


Abb. VI.3(4) Fluoreszenzkurve des Dimer $(\text{Chl})_2$ in Dodecan bei 296 K; nach Subtraktion der überlagerten langsamen Fluoreszenz des DCIII-Dimers; Die durchgezogene Kurve entspricht einem Biexponentialfit mit:

$\tau_i(\text{ps})$	P_i
900	36
130	74

Die gegenüber der Monomerfluoreszenz verkürzte Lebensdauer der $(\text{Chl})_2$ -Fluoreszenz muß durch eine deutliche Erhöhung der Effizienz der nichtstrahlenden Kanäle (Intersystemcrossing bzw. Internal Conversion) verursacht sein. Weiterhin muß die Fluoreszenzrate k_{fl} drastisch reduziert sein, da die Amplituden der Fitfunktionen ansonsten bei gegebener QE nicht proportional der Konzentration dieser Dimere wären (s. Gl. VI(1)). Mit den Werten aus den QE Messungen und den Zeitanalysen der Fluoreszenz läßt sich abschätzen, daß die Fluoreszenzrate des Dimers $k_{\text{fl,D}}$ höchstens 10% von der Fluo-

resonanzrate k_{fl} der Monomere beträgt.

Die Anisotropiespektren der Dimere $(Chl)_2$ zeigen, daß innerhalb des Dimermoleküls ein effektiver Energietransfer vom (Elektronen-) Akzeptor auf den (Elektronen-) Donor stattfindet (s. Abb. V.3(3) und V.3(6); s. Kap. 2.2.3). Im Wellenlängenbereich des jeweils nicht direkt angeregten Teilmoleküls ist die Anfangsanisotropie deutlich geringer als im Emissionsbereich des direkt angeregten Moleküls.

Deutlicher wird dieser Effekt in den bandenkorrigierten Depolarisationskurven beobachtet. Bei resonanter Anregung ($\lambda_{ex}=680\text{ nm}$) des Donormoleküls hat die Anfangsanisotropie seiner Fluoreszenz ($\lambda_{em}=685\text{ nm}$) mit $r_0=0.3$ nahezu den Wert des Monomeren (s. Abb. VI.3(5); man beachte die Überlagerung durch die langsame Depolarisation der DCIII-Dimere). Wird hingegen im Akzeptormolekül des Dimers angeregt ($\lambda_{ex}=660\text{ nm}$) und die Depolarisationskurve der Emission des Donors ($\lambda_{em}=685\text{ nm}$) gemessen, zeigt sich, daß die Anfangsanisotropie ca. - 0.18 beträgt (s. Abb. VI.3(6); man beachte auch hier die Überlagerung durch die langsame Depolarisation der DCIII-Dimere, die jedoch gleichsinnig wie in Abb. VI.3 (5) verläuft).

Hieraus folgt, daß bei direkter Anregung des emittierenden Moleküls (Donor) eine ähnliche Relaxation zwischen Absorptionsdipolrichtung und Emissionsdipolrichtung von $\xi \approx 15^\circ$ wie im Monomer stattfindet. Weiterhin kann zweifelsfrei gezeigt werden, daß die im Akzeptormolekül absorbierte Energie sehr effektiv in den Donor transferiert wird (s. Abb. VI.3(2) bzw. VI.3(3)) und unter einem Winkel zwischen Absorptionsdipolmoment des Akzeptors und Emissionsdipolmoment des Donors von $\xi \approx 90^\circ$ polarisiert wieder emittiert wird.

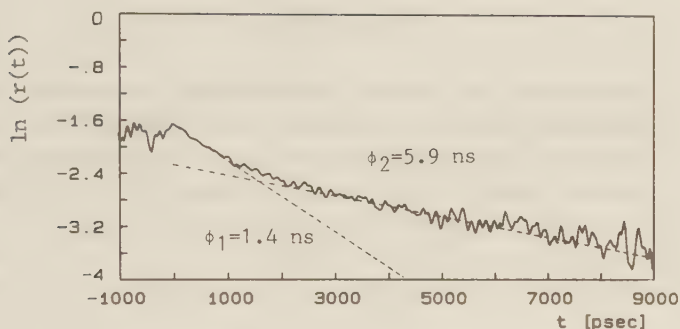


Abb. VI.3(5) Zeitfunktion der Fluoreszenzdepolarisation von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} (\text{Chl})_2$ in Dodecan
 λ_{ex} : 680 nm; λ_{em} : 685 nm;
 Temp.: 264 K (logarithmische Ordinate !)
 berechnet aus bandenkorrigierten Fluoreszenzmessungen; die Messkurve kann als Summe von zwei unterschiedlichen exponentiellen Depolarisationsfunktionen (strichliert) dargestellt werden (s. Text)

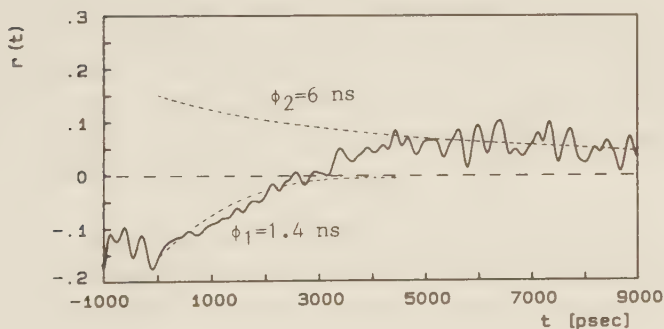


Abb. VI.3(6) Zeitfunktion der Fluoreszenzdepolarisation von $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} (\text{Chl})_2$ in Dodecan
 λ_{ex} : 660 nm; λ_{em} : 685 nm;
 Temp.: 264 K
 analog wie in Abb. VI.3(5)

Im Gegensatz zur nahezu vollständigen Entkopplung der Teilmoleküle dieses Dimers $(\text{Chl})_2$ im Grundzustand (Absorptionsspektren) zeigen diese im angeregten Zustand starke Wechselwirkung, die sich durch einen effektiven, sehr schnellen (kürzer als 30 ps) Energietransfer äußert.

VII. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem selbstaggregierten Chlorophyll a-Dimer (Chl)₂ in unpolaren Lösungsmitteln als Modellsystem für das Photosystem II des Photosyntheseapparates der Höheren Pflanzen. Die Fluoreszenz des PSII selbst wurde in letzter Zeit an Chloroplasten eingehend untersucht /31/. Mit pikosekunden-spektroskopischen Methoden konnten dem PSII Fluoreszenzlebensdauern von 180 bis 600 ps und 1.2 bis 2.4 ns zugeordnet werden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte die Fluoreszenz des (Chl)₂ im Gegensatz zu bisherigen Annahmen / 34/ zweifelsfrei nachgewiesen und quantitativ analysiert werden. Das Fluoreszenzspektrum des (Chl)₂ zeigt ein rotverschobenes Spektrum mit gleicher Struktur wie Chlorophyll a-Monomere. Das Emissionsmaximum liegt bei 685 nm ($14\,600\text{ cm}^{-1}$). Die Quantenausbeute beträgt mit ca. $1.5 \cdot 10^{-3}$ nur ungefähr 0.5% von der Quantenausbeute des Chl a-Monomeren.

Die Fluoreszenzabklingfunktion konnte bestimmt werden. Sie läßt sich durch die Summe von 2 exponentiellen Zerfällen, deren Zeitkonstanten $<100\text{ ps}$ und $\approx 1.0\text{ ns}$ sind, sehr gut charakterisieren. Diese Zeitkonstanten der Fluoreszenz können als deutlicher Hinweis dafür gewertet werden, daß der selbstaggregierte Dimer (Chl)₂ tatsächlich ein valides Modell für das PSII darstellt.

Durch Analyse von Absorptionsmessungen konnte auch für das untersuchte Modellsystem verifiziert werden, daß die beiden Teilmoleküle des Dimer (Chl)₂ im Grundzustand nahezu unabhängige Moleküle sind.

Im Gegensatz hierzu wurde im angeregten Zustand mit Hilfe zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen und zeitaufgelöster Anisotropiemessungen im Pikosekunden-Zeitbereich eine intensive Wechselwirkung der beiden Teilmoleküle nachgewiesen. Es ließ sich ein effektiver Transfer der elektronischen

Anregungsenergie vom Elektronenakzeptor zum Elektronendonator beobachten. Aus den zeitaufgelösten Spektren der Fluoreszenzanisotropie wurde geschlossen, daß auch eine geringe Emission aus dem Elektronenakzeptor erfolgt.

Die Bestimmung der physikalischen Mechanismen des Transfers innerhalb des $(\text{Chl})_2$ -Aggregates erfordert, daß die Zerfallskurve der Fluoreszenz mit höherer Zeitauflösung gemessen werden muß. Um das entsprechende Anklingen der Fluoreszenz auflösen zu können, bedarf es einer Zeitauflösung, die um mindestens eine Größenordnung besser ist als die in dieser Arbeit erreichte Auflösung von 30 ps.

Ein solches Verfahren könnte die Erzeugung der Summenfrequenz aus der Fluoreszenz der Dimere $(\text{Chl})_2$ und dem Licht eines Pikosekunden- bzw. Femtosekunden-Laserpulses in einem nicht-linearen Kristall sein. Erste Experimente mit dieser Technik wurden mit großem Erfolg in der Arbeitsgruppe Molekül- und Biophysik der Universität Oldenburg bereits durchgeführt.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit ließe sich eine neue Hypothese für den Aufbau der funktionalen Einheit, in der die eigentliche Ladungstrennung im PSII abläuft, aufstellen. Es konnte gezeigt werden, daß die Anregungsenergie effizient in das Donormolekül transferiert wird. Dieses Donormolekül müßte aber nicht notwendigerweise ein weiteres Chlorophyll a-Molekül sein, sondern es könnte statt dessen ebenso ein Pheophytin a sein, ohne daß sich die spektralen Eigenschaften deutlich ändern würden. Nach neuesten Ergebnissen / 92/ ist ein Pheophytin a-Molekül der primäre Akzeptor nach der Primäranregung im PSII. In einem PSII, das aus einem Chlorophyll/Pheophytin-Aggregat / 44/ bestünde, würde dann die Anregungsenergie aus dem CIII-Antennensystem analog zum beobachteten intramolekularen Transfer des $(\text{Chl})_2$ Dimer direkt in das Pheophytin übertragen werden. Erst im Pheophytin fände dann die eigentliche Ladungstrennung statt.

VIII. Literatur

- / 1/ Albers, B.A.; Keller, W.W.A.; Maier-Schwartz, K.;
Strauss, E.;
Vortrag, DPG Frühjahrstagung, Münster
1984
- / 2/ Alfano, A.J.; Lytle, F.E.; Showell, M.S.; Fong, F.K.;
J. Chem. Phys. 82(2), 758
1985
- / 3/ Ballschmiter, K.; Cotton, T. M.; Strain, H. H.;
Katz, J.J.;
Biochim. Biophys. Acta 180, 347
1969
- / 4/ Ballschmiter, K.; Tuesdell, K.; Katz, J.J.;
Biochim. Biophys. Acta 184, 604
1969
- / 5/ Bowers, P.G.; Porter, G.;
Proc. R. Soc. (London) A 296, 435
1967
- / 6/ Boxer, S.G.; Closs, G.L.;
J. Am. Chem. Soc. 98, 5406
1976
- / 7/ Broyde, S.B.; Brody, S.S.;
J. Chem. Phys. 46, 3334
1967
- / 8/ Butler, W.L.;
Ann. Rev. Plant Physiol. 29, 345
1978
- / 9/ Butler, W.L.; Strasser, R.J.;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 74, 3382
1977
- / 10/ Clayton, R.K.;
Photosynthesis
Cambridge University Press, Cambridge
1980
- / 11/ Connolly, J. S.; Janzen, A. F.; Samuel, E. B.;
Photochem. Photophys., 36, 559
1982
- / 12/ Cotton, T.M.;
Ph.D. Thesis, Northwestern University, Evanston (Illinois)
1976

- / 13/ Cotton, T.M.; Loach, P.A.; Katz, J.J.;
Ballschmitter, K.;
Photochem. Photobiol. 27, 735
1978
- / 14/ Cotton, T.M.; Trifunac, A.D.; Ballschmitter, K.;
Katz, J.J.;
Biochim. Biophys. Acta 368, 181
1974
- / 15/ Deisenhofer, J.; Michel, H.; Huber, R.;
Trends Biochem. 10, 243
1985
- / 16/ Demas, J.N.;
Excited States Lifetime Measurements
Academic Press, New York
1983
- / 17/ Evans, T.A.; Katz, J.J.;
Biochem. Biophys. Acta 396, 414
1975
- / 18/ Fong, F.K. (Ed.);
Light Reaction Path of Photosynthesis
Springer-Verl. Berlin
1982
- / 19/ Fong, F.K.; Koester, V.J.;
Biochim. Biophys. Acta 423, 52
1976
- / 20/ Fong, F.K.; Koester, V.J.; Galloway, L.;
J. Am. Chem. Soc. 99, 2372
1977
- / 21/ Fong, F.K.; Kusunoki, M.; Galloway, L.; Matthews, T.G.;
Lytle, F.E.; Hoff, A.J.; Brinkman, F.A.;
J. Am. Chem. Soc. 104, 2759
1982
- / 22/ Gouterman, M.;
J. Mol. Spectr. 6, 138
1961
- / 23/ Gouterman, M.;
in Dolphin, D.;
The Porphyrins
Academic Press, New York
1978
- / 24/ Govindjee; Jursinic, P.A.;
Photochem. Photobiol. Reviews 4, 125
1979

- / 25/ Govindjee; Kambara, T.; Coleman, W.;
Photochem. Photobiol. 42(2), 187
1985
- / 26/ Gross, J.;
Diplomarbeit, Universität Oldenburg
1984
- / 27/ Hill, R.; Bendall, F.;
Nature 186, 136
1960
- / 28/ Hindman, J.C.; Kugel, R.; Wasielewski, M.R.;
Katz, J.J.;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2076
1978
- / 29/ Hoffmann, P.; Leupold, D.; Hieke, B.; Voigt, B.;
Biochem. Physiol. Pflanzen 173, 460
1978
- / 30/ Holzwarth, A.R.;
in Michel-Beyerle, M.E.;
Antennas and reaction Centers of Photosynthetic
Bacteria
Springer, Berlin
1985
- / 31/ Holzwarth, A.R.;
Photochem. Photobiol. 43(6), 707
1986
- / 32/ Hunt, J.E.; Katz, J.J.; Svirnickas, A.; Hindman,
J.C.;
J. Am. Chem. Soc. 106, 2242
1984
- / 33/ Katz, J.J.; Hindman, J.C.;
in Alfano, R.R;
Biological Events Probed by Ultrafast Laser Spectroscopy
Academic Press, New York
1982
- / 34/ Katz, J.J.; Norris, J.R.; Shipman L.L.;
Brookhaven Symposia in Biology 1977(28), 16
1977
- / 35/ Katz, J.J.; Shipman, L.L.; Cotton, T.M.; Janson, T.R.;
in D.Dolphin;
The Porphyrins Vol. 5
Academic Press, New York
1978
- / 36/ Katz, J.J.; Shipman, L.L.; Norris, J.R.;
CIBA Foundation Symp. 61; Amsterdam Excerpt. Med., 1
1979

- / 37/ Keller, W.W.A.; Albers, B. A.; Maier-Schwartz, K.;
Strauss, E.;
Jahrestg. der Dt. Bunsengesellschaft, Kaiserslautern
1984
- / 38/ Keller, W.W.A.; Albers, B.A.; Strauss, E.;
Maier-Schwartz, K.;
J. of Lumin. 31 & 32, 892
1984
- / 39/ Livingston, R.; Watson, W.F.; McArdle, J.;
J. Am. Chem. Soc. , 71, 1542
1949
- / 40/ Livingston, R.; Watson, W.F.; McArdle, J.;
J. Am. Chem. Soc. 71 (1949), 1542
1949
- / 41/ Livingston, R.; Weil, S.;
Nature 170, 750
1952
- / 42/ Madge, D.; Berens, S.J.; Butler, W.L.;
Proc. Soc. Photo. Opt. Instr. Eng. 322, 80
1982
- / 43/ Madge, D.; Brannon, J.H.; cremers, T.L.; Olmsted,
J.III;
J. Phys. Chem. 83(6), 696
1979
- / 44/ Maier-Schwartz, K.;
priv. Mitteilung
1986
- / 45/ Melis, A.; Duysens, L.N.M.;
Photochem. Photobiol. 29, 373
1979
- / 46/ Merkelo, H.; Hartmann, S.R.; Mar, T.; Singhal, G.S.;
Govindjee;
Science 164, 301
1969
- / 47/ Mockler, H.W.; Collins, R.J.;
Appl. Phys. Let. 7, 270
1965
- / 48/ Moffit, W.;
J. Chem. Phys. 22, 320
1954
- / 49/ Moffit, W.;
J. Chem. Phys. 22, 1820
1954

- / 50/ North, A.,M.; Pethrick, R.,A.; Kryszewski, M.;
Nadolski, M.;
Acta Physica Polonica A54, 797
1978
- / 51/ Omata, T.; Murata, N.;
Photochem. Photobiol. 31, 183
1980
- / 52/ Papageorgiou, G.;
in Govondjee;
Bioenergetics of Photosynthesis
Academic Press, New York
1975
- / 53/ Pellin, M.J.; Wasielewski, M.R.; Kaufmann, K.J.;
J.Am.Chem.Soc. 102, 1868
1980
- / 54/ Petke, J.D.; Maggiora, G.M.; Shipman, L.;
Christoffersen, R.E.;
Photochem. Photobiol. 30, 203
1979
- / 55/ Petrich, J.W.; Fleming, G.R.;
Photochem. Photobiol. 40, 775
1984
- / 56/ Rabinowitch, E.; Govindjee;
Photosynthesis
John Wiley & Sons, New York
1969
- / 57/ Renge, I.; Avarmaa, R.;
Photochem. Photobiol. 42(3), 253
1985
- / 58/ Renger, G.;
in Hoppe,W.; Lohmann, W.; Markl, H.; Ziegler, H.;
Biophysik
Springer Verl., Berlin
1982
- / 59/ Reynolds, A.H.; Rentzepis, P.M.;
Adv. Bot. Res. vol. 8, 1
1980
- / 60/ Satoh, K.;
Photochem. Photobiol. 42(6), 845
1985
- / 61/ Schatzberg, P.;
J. Phys. Chem. 67, 776
1963

- / 62/ Scherz, A.; Levanon, H.;
Molec. Phys. 55, 923
1985
- / 63/ Scholz, B.; Willaschek, K.D.; Mueller, H.;
Ballschmiter, K.;
J. Chromatogr. 208(b), 156
1981
- / 64/ Seely, G.R.; Jensen, R.G.;
Spectrochim. Acta 21 (1965) 1835
1965
- / 65/ Shipman, L.L.;
J. Phys. Chem. 81, 2180
1977
- / 66/ Shipman, L.L.; Cotton, T.M.; Norris, J.R.; Katz,
J.J.;
J. Am. Chem. Soc. 98, 8222
1976
- / 67/ Shipman, L.L.; Janson, T.R.; Ray, G.J.; Katz, J.J.;
Proc. Nat. Acad. Sci. USA , 72, 2873
1975
- / 68/ Simpson, W.T.;
J. Chem. Phys. , 17, 1218
1949
- / 69/ Terbrack, S.;
Diplomarbeit Universität Oldenburg
1986
- / 70/ Vermaas, W.F.J.; Govindjee;
Photochem. Photobiol. 34, 775
1981
- / 71/ Ware, W.R.; Lamola, A.A. (ed.);
Creation and Detection of the Excited State
Marcel Dekker, New York
1971
- / 72/ Wasiliewsky, M.R.;
in Fong, F.K.;
Light Reaction Path of Photosynthesis
Springer Verl., Berlin
1982
- / 73/ Weber, G.; Teale, F.W.J.;
Trans. Far. Soc., 54, 640
1958
- / 74/ Weiss, C.;
J. Mol. Spectr. 44, 37
1972

- / 75/ Wilton, A.C. de; Haley, L.V.; Koningstein, J.A.;
J. Phys. Chem. 88, 1077
1984
- / 76/ Wilton, A.C. de; Koningstein, J.A.;
J. Phys. Chem. 87(2), 185
1983
- / 77/ Wong, D.;
in Alfano, R.R.;
Biological Events Probed by Ultrafast Laser
Spectroscopy
Academic Press, New York
1982
- / 78/ Yuen, M.J.; Shipman, L.L.; Katz, J.J.; Hindman, J.C.;
Photochem. Photobiol. 32, 281
1980
- / 79/ Yuen, M.J.; Shipman, L.L.; Katz, J.J.; Hindman, J.C.;
Photochem. Photobiol. 36, 211
1982
- / 80/ Hoff, A.J.; Lendzian, F.; Moebius, K.; Lubitz, W.;
Chem. Phys. Lett. 85(1), 3
1982
- / 81/ Fong, F.K.;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3692
1974
- / 82/ Kooyman, R.P.H.; Schaafsma, T.J.;
J. Am. Chem. Soc. 106, 551
1984
- / 83/ Dvornikov, S.S.; Knyukshto, V.N.; Solovev, K.N.;
Stanishevskii, I.V.; Stakhin, A.S.; Turkova, A.E.;
Opt. Spectrosc. (USSR) 57(2), 142
1984
- / 84/ Tao, T.;
Biopolym. 8, 609
1969
- / 85/ Robbins, R.J.;
Thesis, University of Melbourne
1980
- / 86/ Sibbett, W.; Taylor, J.R.; Welford, D.;
IEEE J. of Quant. Electr. 17(4), 500
1981
- / 87/ Kinoshita, S.; Kushida, T.;
Rev. Sci. Instr. 53(4), 469
1982

- / 88/ Knight, A.E.W.; Selinger, B.K.;
Aust. J. Chem. 26,1
1973
- / 89/ Albers, B.;
Diplomarbeit, Universität Oldenburg
1984
- / 90/ Landolt-Börnstein
Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie,
Astronomie, Geophysik und Technik
Springer Verl., Berlin
1980
- / 91/ Tang, C.W.; Albrecht, A.C.;
Mol. Cryst. Liq. Cryst. 25, 53
1974
- / 92/ Klimov, V.V.;
in Sybesma, C.;
Advances in Photosynthesis Research Vol. I
M. Nijhoff/Dr. W. Junk, Den Haag
1984
- / 93/ Dolphin, D.;
The Prophyrins Vol. III
Academic Press, New York
1978

Danksagung

Diese Arbeit wurde nur möglich, weil meine Frau Anita in liebevoller Geduld auf viele Stunden gemeinsamer Zeit verzichtet hat. Ihr gilt mein besonderer Dank.

Ich bedanke mich an dieser Stelle gerne bei meinem Betreuer Khz. Maier-Schwartz, der mit großem persönlichem Einsatz an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe Molekül- und Biophysik der Universität Oldenburg, deren Mitglieder ohne Ausnahme stets zu tatkräftiger Hilfe und anregenden Diskussionen bereit waren. Besonders bedanke ich mich bei:

B. Albers, A. Geißler, W. Jürgens, R. Nasilowsky, D. Otteken, W. Seelert, E. Strauss, S. Terbrack und W. Tuszyński.

Für Rat und Tat in Rechnerfragen danke ich H. Havemann vom Rechenzentrum der Universität Oldenburg

U. Juhl sei für ihre freundliche Unterstützung beim Erlernen der biochemischen Präparation von Chl a gedankt.

Mein Dank gilt ferner J.K. Blum für sein unermüdliches Bestreben mir die Künste der Chemie näherzubringen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei den Werkstätten der Universität Oldenburg, wobei ich besonders die Glaswerkstatt erwähnen möchte.

Allen nichtgenannten Kolleginnen und Kollegen, die Teil hatten an der Entstehung dieser Arbeit, hier jedoch nicht namentlich genannt wurden, sei ausdrücklich gedankt.

Lebenslauf

21. 03. 1953	Geburt in Recklinghausen als viertes von sieben Kindern des Bergmanns Josef Keller und seiner Frau Johanna; Staatsangehörigkeit: deutsch
09. 04. 1959 - Sept. 1963	Volksschule Herten
Sept. 1963 - Sept. 1970	Humanistisches Gymnasium und Claretiner-Internat Weißenhorn/Bayern
Sept. 1970 - 23. 06. 1972	Fachoberschule für Sozialpädagogik Neu-Ulm
23. 03. 1972	Fachhochschulreife für Sozialpädagogik
Okt. 1972 - 26. 11. 1973	Priv. Gymnasium Gabbe's Lehranst. Berlin
26. 11. 1973	Allgemeine Hochschulreife
02. 01. 1974 - 31. 12. 1975	Bundeswehr
01. 04. 1976 - 29. 09. 1982	Physikstudium an der Uni. Oldenburg
16. 04. 1982	Heirat mit Anita Wulff
29. 09. 1982	Diplom in Physik
seit 01. 11. 1982	wissenschaftlicher Angestellter und Doktorand am Fachbereich Physik der Universität Oldenburg
15. 06. 1985	Geburt meines Sohnes Jan-Hendrik

